

**Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia**

**Estudo da expressão de genes regulada por ferro
em fungos ligninolíticos**

ELIANA MARIA ASSMANN

**Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas, para
obtenção do título de Doutor em Genética e
Biologia Molecular – Área de Concentração
Genética de Microrganismos**

Orientadora: Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello

Co-Orientadora: Profa. Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni

CAMPINAS

2003

Data da Defesa: 29/10/2003

BANCA EXAMINADORA

Dra. Maricilda Palandi de Mello

Assinatura

Dra. Angela Mehta

Assinatura

Dr. André Luiz Ferraz

Assinatura

Dr. Celso Eduardo Benedetti

Assinatura

Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

Assinatura

Dr. Wanderley Dias da Silveira

Assinatura

Dra. Maria Risoleta Freire Marques

Assinatura

Dedico esta Tese
À minha família.
Em especial:
ao meu pai, à minha mãe e ao Mauro

(Em Memória a meu pai)

Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes,
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.
(Fernando Pessoa)

AGRADECIMENTOS

Em cada etapa deste trabalho recebi, de pessoas que me rodeiam, apoio incondicional e à estas gostaria de agradecer de todo coração.

À Profa. Dra. Maricilada Palandi de Mello, pela orientação neste trabalho, apoio e amizade;

À Profa. Dra. Laura M. M. Ottoboni, pela co-orientação, apoio e valiosas sugestões dadas no decorrer deste estudo;

À Profa. Dra. Adriane M. F. Milagres, do DEBIQ da FAENQUIL, por ter permitido o uso das instalações de seu laboratório para realização dos inóculos e crescimento dos fungos, além da doação de reagentes necessários para obtenção da solução de CAS e valiosas sugestões dadas na correção desta Tese na pré-banca;

Ao Prof. Dr. André Ferraz, por permitir a realização dos experimentos descritos no Capítulo 1 em seu Laboratório, no Departamento de Biotecnologia (DEBIQ) da Faculdade de Engenharia Química de Lorena (FAENQUIL), e ainda, pelas valiosas sugestões na correção do artigo publicado na *Environmental Microbiology* e da Tese;

À Dra. Angela Machuca, por ter me recebido tão carinhosamente em sua casa por dois meses e pelo valioso auxílio na obtenção dos cultivos dos inóculos dos fungos e na obtenção da curva de reação com CAS;

À Dra. Angela Mehta, pela participação na Banca Examinadora;

Ao Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti, pela participação na Banca Examinadora;

Ao Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, pela participação na Banca Examinadora;

Ao Prof. Dr. Jörg Kolbarg, pelas valiosas sugestões dadas na Pré-banca desta Tese;

Aos técnicos José Moreira, José Carlos da Silva e Jussara Salet da Silva do Laboratório de Química de Lignocelulósicos, do Departamento de Biotecnologia da FAENQUIL, pela paciência, amizade e auxílio durante todo o tempo que passei em Lorena;

À técnica Maria Madalena Vasconcelos, do Laboratório de Genética Humana (CBMEG), pelo imenso auxílio e alegria em todos os momentos deste trabalho;

À querida amiga Ana Maria, pela grande amizade surgida durante minha estada em Lorena e que permanece até hoje;

Aos queridos Jorge e Luzinha, orientados da Profa. Dra. Laura Ottoboni, que foram meus maiores mestres e que me receberam com tanto carinho e paciência na minha chegada ao CBMEG;

Às queridas Marcela e Ivy (mestras e amigas), pela amizade desde o começo e pelas inúmeras sugestões, ensinamentos e momentos felizes durante todo o tempo que estivemos juntas;

Às igualmente queridas Ericka, Fabiana e Fernanda Reis, pela amizade, apoio quando as coisas pareciam não dar certo (as vezes não davam mesmo) e momentos alegres (e tristes também) que foram muito importantes para mim;

Aos amigos Andrey, Marcelo, Hamilton, Eduardo, Osmar, Lúcio e amigas Edna, Angela, Sandrinha, Camila, Lucy e Sandra pelas lembranças dos momentos alegres que passamos juntos;

Aos colegas do CBMEG, Teresa, Antônia, Alexandre, Luis Eduardo, Tiago, Raquel, Fernanda Coeli, Mariana, Fernanda Soardi, Daniela, Juliana e Junia, pelo convívio nestes anos todos;

À Claudia, Patrícia, Maria Eugênia e Flávia, do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, que apesar do pouco tempo de convívio me apoiaram e torceram por mim na defesa desta Tese;

As minhas queridas amigas Helga, Silvia, Eliane, Juliana, Annette e ao amigo Mozart que são minha família científica que sempre torceu por mim à distância e que sempre me apoiou desde o tempo de iniciação científica e me incentivou a buscar novos horizontes;

Àos meus amados irmãos e amadas irmãs-cunhadas, Eduardo, Barbara, Fábio e Graziela, por torcerem muito por mim;

Às minhas amadas irmãs-amigas, Lurdete, Marta e Elizabete pela amizade, amor e apoio em todos os momentos, em especial no final do ano que passou;

À minha mãe Clarissa (ou melhor supermãe), pelo amor, pelo apoio e exemplo de força e de mulher, obrigada por me dar tudo que eu mais preciso sempre;

Ao meu pai Milton (*In Memmoriám*), pelo amor, por acreditar sempre em mim, pelo exemplo de força, dignidade e caráter; por tudo e mais um pouco. Queria que tu estivesse comigo neste momento e creio que está. Obrigada por cada segundo que tivemos juntos;

Ao meu marido Mauro, por ter sido a mais importante descoberta que eu fiz em toda a minha vida, pelo amor e apoio inestimável em todos os momentos.

À FAPESP, pelo apoio financeiro dado a este estudo na forma de bolsa de Doutorado (97/14314-2) e do projeto temático (98/00548-4).

ABREVIATURAS

%	Porcentagem
⁰ C	Graus Celsius
2-DE	Eletroforese de Segunda Dimensão
AP	<i>Adapter Primer</i>
Atm	Atmosfera
ATP	adenosina 5'-trifosfato
AUAP	<i>Abridged Universal Amplification Primer</i>
BAP	<i>Bacterial Alkaline Phosphatase</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Albumina Soro Bovina
CAS	Cromo Azurol S
CTAB	<i>Cetyldimethylethylammonium bromide</i>
Da	Daltons
dATP	Deoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	Deoxicitidina 5'-trifosfato
DD	<i>Differential display</i>
DDRT-PCR	<i>Differential Display Reverse Transcription-PCR</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNase	Desoxiribonuclease
dNTP	Deoxiribonucleosídeo trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
GLOX	Glioxal oxidase
GSP	<i>Gene Specific Primer</i>
GTP	Guanosina 5'-trifosfato
h	Hora
HDTMA	<i>Hexadecyltrimethyl-ammonium bromide</i>
Kb	Kilobases
KDa	Kilodaltons

LiP	Lignina Peroxidase
LMMC	<i>Low Molecular Mass Compounds</i>
M	Molar
mA	Miliamperes
ME	Extrato de malte
MEA	Extrato de malte-ágar
μCi	Microcurie
μg	Micrograma
μL	Microlitros
μM	Micromolar
mg	Miligramas
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MnP	Manganês Peroxidase
MOPS	<i>3-(N-Morpholino)ropanesulfonic Acid</i>
M _r	Massa molar
MW	<i>Molecular Weight</i>
NBD	<i>Nucleotide Binding Domain</i>
NGSP	<i>Nested Gene Specific Primer</i>
nm	Nanômetro
NUP	<i>Nested Universal Primer</i>
pb	pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Concentração de íons de hidrogênio, logaritmo negativo
pI	Ponto Isoelétrico
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl Fluoride</i>
PVP	Polivinilpirrolidona
RACE	<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>
RAP-PCR	<i>RNA Arbitrary primed-Polymerase Chain Reaction</i>

RNase	Ribonuclease
rpm	Rotações por minuto
s	Segundos
SDS	Duodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Duodecil Sulfato de Sódio–Eletroforese em gel de acrilamida
SRE	<i>Siderophore Repressor Element</i>
SREA	<i>Siderophore Repressor Element of Aspergillus</i>
SREP	<i>Siderophore Repressor Element of Penicillium</i>
TMD	<i>Transmembrane Domain</i>
Tris	Tris (hidroximetil) – Aminometano
U	Unidade
UPM	<i>Universal Primer Mix</i>
V	Volt
v/v	volume/volume
W	Watt

ÍNDICE

RESUMO	1
ABSTRACT	3
INTRODUÇÃO	5
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
1. Fungos ligninolíticos	9
2. <i>Phanerochaete chrysosporium</i> e <i>Lentinula edodes</i>	9
3. Lignina	11
4. Enzimas envolvidas na degradação da madeira	11
5. Compostos de baixa massa molar	12
6. Ferro	14
7. Sistemas de aquisição de ferro em bactérias	15
8. Sistemas de aquisição de ferro em fungos	19
OBJETIVOS	24
CAPÍTULO 1. ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA O ESTUDO DE GENES ENVOLVIDOS NA AQUISIÇÃO DE FERRO EM FUNGOS QUE DEGRADAM MADEIRA.	
1. Introdução	26
2. Materiais e métodos	27
2.1 Espécies de fungo utilizadas	27
2.2 Manutenção das culturas	27
2.3 Tratamento da vidraria	27
2.4 Condições de crescimento	28
2.5 Obtenção da curva de crescimento	28
2.6 Dosagem de sideróforos com CAS (Cromo Azurol S)	29
3. Resultados e discussão	30
4. Conclusões	37

Artigo 1. Proteins induced by iron-starvation in white-rot fungi correlate to the production of iron-chelating compounds.	38
---	----

CAPÍTULO 2. ESTUDO DA EXPRESSÃO GÊNICA REGULADA POR FERRO EM *P. chrysosporium* PELO MÉTODO DDRT-PCR.

1. Introdução	58
Artigo 2. Iron-Responsive genes of <i>Phanerochaete chrysosporium</i> isolated by Differential Display Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction.	59

CAPÍTULO 3. ISOLAMENTO DE GENES UTILIZANDO *PRIMERS* DEGENERADOS BASEADOS EM DOMÍNIOS CONSERVADOS DOS FATORES DE TRANSCRIÇÃO DA FAMÍLIA GATA.

1. Introdução	72
2. Materiais e métodos	74
2.1 Condições de crescimento	74
2.2 Amplificações utilizando DNA genômico	74
2.2.1 Extração de DNA	74
a) Método de Zhang <i>et al.</i> (1996)	75
b) Método de Wang <i>et al.</i> (1993)	75
c) Extração com o Dneasy Plant Mini Kit (QIAGEN)	76
2.2.2 PCR com <i>primers</i> degenerados	76
2.3 Amplificações utilizando cDNA como molde	76
2.3.1 Extração de RNA	77
a) Método de Logemann <i>et al.</i> (1987)	77
b) Extração com TRIzol TM (Invitrogen TM)	77
c) Método de Windericks & Castro (1994)	77
d) Método de Sokolovsky <i>et al.</i> (1995)	78
2.3.2 Síntese de cDNA utilizando o sistema 3' RACE (Invitrogen TM)	78
2.3.3 PCR com <i>primers</i> degenerados	79
2.3.4 PCR <i>nested</i>	79
2.3.5 Clonagem	81

2.3.6 Mini-preparação dos plasmídios	81
2.3.7 Sequenciamento	82
2.3.8 <i>Northern blotting</i>	82
2.3.9 Hibridização	83
3. Resultados e discussão	85
3.1 Isolamento de genes utilizando DNA como molde	85
3.1.1 Extração de DNA	85
3.1.2 PCRs com <i>primers</i> degenerados utilizando DNA como molde	85
3.2 Isolamento de genes utilizando cDNA como molde	86
3.2.1 Extração de RNA total	86
3.2.2 Reações de amplificação	87
3.2.3 Clonagem, sequenciamento e alinhamento no GenBank	87
3.2.4 Confirmação da expressão diferencial dos transcritos isolados por meio de RACE	91
4. Conclusões	102

CAPÍTULO 4. ISOLAMENTO DE GENES UTILIZANDO *PRIMERS* ESPECÍFICOS DESENHADOS COM BASE NA SEQÜÊNCIA DO FRAGMENTO 2.3.

1. Introdução	104
2. Materiais e métodos	106
2.1 Síntese de cDNA	106
2.2 Reações de PCR	109
2.3 PCR <i>nested</i>	109
3. Resultados e discussão	110
4. Conclusões	123

CAPÍTULO 5. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM GENE DA FAMÍLIA DE TRANSPORTADORES DO TIPO ABC DE *P. chrysosporium*.

1. Introdução	126
2. Materiais e Métodos	130
2.1 Construção de um mini-banco com DNA de <i>P. chrysosporium</i>	130
2.1.1 Extração de DNA	130

2.1.2 <i>Southern blotting</i>	130
2.1.3 Hibridização	131
2.1.4 Digestão do DNA de <i>P. chrysosporium</i> para clonagem no mini-banco	132
2.1.5 Clonagem no vetor pUC18	132
2.1.6 <i>Colony blotting</i>	133
2.1.7 <i>Screening</i> do mini-banco com a sonda 2.3	134
2.2 Isolamento da sequência completa do gene P14A1	135
2.2.1 Obtenção da sequência completa do inserto do clone P14A1	135
2.2.2 Síntese de cDNA para a obtenção da sequência completa do cDNA ABC de <i>P. chrysosporium</i> .	135
2.2.3 Reações de PCR	136
3. Resultados e discussão	139
3.1 Construção de um mini-banco com DNA de <i>P. chrysosporium</i>	139
3.1.1 <i>Southern blotting</i>	139
3.1.2 <i>Colony blotting</i>	140
3.2 Isolamento da sequência completa do gene P14A1	149
3.2.1 Obtenção da sequência completa do inserto do fragmento P14A1	149
3.2.2 Obtenção da sequência completa do transcrito de P14A1	150
4. Conclusões	159
CONCLUSÕES GERAIS	161
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	162
ANEXO I	180
ANEXO II	184

RESUMO

Este estudo foi realizado com o objetivo de identificar e isolar genes regulados por ferro que estejam envolvidos tanto na via biossintética e de transporte de sideróforos, como envolvidos em outras rotas metabólicas cuja regulação seja dependente de ferro e que sejam importantes para os processos celulares e de degradação da madeira, buscando contribuir para o conhecimento destas vias metabólicas nos fungos de degradação branca *Phanerochaete chrysosporium* e *Lentinula edodes*. Para tanto, micélio de cada fungo foi crescido em duas condições diferenciais de concentração de ferro. Três abordagens principais foram utilizadas para alcançar os objetivos propostos. Na primeira, utilizou-se o método de *display* diferencial, para a detecção quantitativa de diferenças no padrão de expressão gênica entre duas condições de concentração de ferro. Na busca do homólogo, em fungos de degradação branca, do gene codificador da proteína reguladora da captação de sideróforos, geralmente uma proteína da família GATA, uma segunda abordagem foi utilizada. A metodologia RACE foi empregada para o isolamento de cDNAs utilizando *primers* degenerados para a sequência altamente conservada dos domínios dedo de zinco das proteínas da família GATA. A partir de um fragmento de cDNA cuja sequência de aminoácidos deduzida apresentou homologia com proteínas reguladoras da síntese de sideróforos, foi construído um mini-banco com fragmentos genômicos de *P. chrysosporium* com o intuito de identificar a sua sequência genômica.

Por *display* diferencial, um total de 97 fragmentos de cDNA de *P. chrysosporium* foram identificados. O alinhamento das sequências de aminoácidos deduzida para 63 fragmentos no GenBank indicou que 14 fragmentos codificam peptídios similares a proteínas hipotéticas, 24 não apresentaram similaridade com as sequências do banco. Dezoito e sete fragmentos obtidos respectivamente em carência e em suprimento de ferro alinharam com proteínas conhecidas e tiveram a expressão analisada por *Northern blotting*. Para 15 transcritos (13 carência, 2 suprimento) a expressão ferro-regulada foi confirmada. Os fragmentos cuja expressão foi induzida pela carência de ferro no meio foram similares à: uma polyketide synthase (PKS), uma proteína TonB, uma provável proteína transmembrana, uma permease da família de transportadores ABC e uma proteína relacionada à proteína de choque térmico HSP70. A PKS e a proteína TonB, são normalmente expressas em condições de deficiência de ferro e estão envolvidas respectivamente na biossíntese e no transporte de

sideróforos. Um dos fragmentos com expressão induzida pela presença de ferro no meio codifica parte de uma proteína homóloga à CNOT3, regulador global da transcrição da RNA polimerase II, e o segundo codifica parte de um peptídeo similar ao fator de maturação de proteossomos, upm1.

Através do método RACE foram isolados 7 fragmentos de *P. chrysosporium* cuja expressão ferro-regulada foi confirmada por *Northern blotting*, sendo um destes induzido por alta concentração de ferro e o restante induzido pela carência de ferro no meio de cultivo. Os alinhamentos realizados indicaram homologias com as proteínas ZNT2, LysR e TonB, sendo que a primeira está envolvida na regulação do transporte de zinco e as outras estão envolvidas na regulação da síntese e transporte de quelantes de ferro. A sequência de aminoácidos deduzida para o transcrito 2.3 de *P. chrysosporium*, cuja expressão regulada por alta concentração de ferro foi confirmada, alinhou com as de fatores de transcrição envolvidos na regulação da biossíntese de sideróforos de outros fungos. Para *L. edodes* 20 fragmentos foram isolados e mostraram homologias com proteínas importantes para diferentes processos celulares. Entretanto, somente dois fragmentos tiveram a expressão ferro-regulada confirmada, sendo esta induzida pela carência de ferro. A sequência de um destes transcritos alinhou com as proteínas Fre1p e Fre2p de levedura, as quais são metaloredutases envolvidas no sistema de captação de ferro sideróforo-dependente.

O método RACE foi novamente empregado usando-se *primers* específicos do fragmento 2.3. Foram obtidos inúmeros fragmentos que mostraram forte similaridade com sequências depositadas no banco de dados. Entre estas, chamaram a atenção: uma glicoproteína de membrana, um possível receptor vacuolar, uma L-aminoácido oxidase, ATPases de diversas espécies, diferentes precursores de lignina peroxidases e, ainda, a poliubiquitina 5 de *P. chrysosporium*. Entretanto, a expressão regulada por ferro foi confirmada somente para o fragmento que apresentou homologia com a poliubiquitina 5.

Por último, foi construído um mini-banco contendo fragmentos de DNA digerido com *Pvu* II de 2.000-3.000 pb selecionados com base na homologia com o fragmento 2.3 de *P. chrysosporium*. Dentre estes clones, um mostrou homologia com proteínas transportadoras ABC, as quais em bactérias estão envolvidas na via de transporte do sistema de captação de ferro mediado por sideróforos. O transcrito completo que codifica a proteína ABC de *P. chrysosporium* foi sequenciado e caracterizado.

ABSTRACT

The aim of this study was to identify and isolate iron-regulated genes that are involved in both siderophore biosynthetic and transport paths. The characterization of genes involved in other metabolic routes important to cellular processes and wood degradation, which expression is iron-mediated, was also performed to contribute to the knowledge of metabolic pathways in the white-rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Lentinula edodes*. Mycelia of each fungi were cultured under two differential iron growth conditions. Three strategies were used to reach the objectives. The first strategy was the differential display technique, which allowed the quantitative detection of differences in the gene expression pattern between the two iron growth conditions. To isolate a white-rot fungi homologous gene that encodes a siderophore uptake regulator, generally a GATA transcription factor, a second strategy was followed. The RACE method was used to synthesize cDNAs with degenerated primers homologous to the sequence of the highly conserved zinc finger domains of GATA proteins. Finally, a genomic mini-library was obtained with *P. chrysosporium* Pvu II DNA fragments. The aim of this step was to identify the genomic sequence corresponding to the 2.3 partial cDNA isolated in the second approach of this study.

A total of 97 differentially expressed cDNA fragments of *P. chrysosporium* were identified. Sequence alignments with GenBank sequences using the BLASTX function showed that 14 fragment sequences aligned to hypothetical proteins and 24 did not present similarity to any sequence in the database. The sequence of 18 and 7 fragments obtained under iron-deplete and replete conditions, respectively, exhibited similarity to known proteins. Those fragments were used as probes in Northern blots to confirm their iron dependent expression. The iron-regulated expression was confirmed for 15 fragments (13 iron-deficient; 2 iron-replete). Transcripts induced under iron-starvation exhibited homologies to: a PKS (polyketide synthase), a TonB protein, a probable transmembrane protein, a putative ABC transporter permease and a HSP70-related heat-shock protein. PKS and TonB proteins are normally expressed under iron-starvation and are known to be involved in biosynthesis and transport of siderophores, respectively. The expression induced by the presence of iron was confirmed for two fragments: one of them is homologous to the CNOT3, which is a global regulator of

RNA polymerase II transcription, and the other encodes a putative proteasome maturation factor upm1.

Seven cDNA fragments were isolated for *P. chrysosporium* by the RACE methodology, and had their iron-regulated expression confirmed by Northern blot. One fragment was induced by the presence of iron in growth medium, and the remaining were induced under iron-starvation. Alignment to sequences in the database indicated homologies to the sequences of ZNT2, LysR and TonB proteins. ZNT2 is involved in the regulation of the zinc transport, and LysR and TonB proteins are involved in the regulation of the synthesis and transport of iron chelators, respectively. The deduced protein sequence of transcript 2.3, which was induced by high concentration of iron, aligned to GATA transcription factors that are involved in siderophore biosynthesis regulation of different fungi. For *L. edodes* several fragments were isolated and showed high homology with the sequences of GenBank. However, only one fragment induced by iron starvation had the expression confirmed by Northern blot. The sequence of this transcript aligned to the deduced sequences of yeast Fre1p and Fre2p, which are metalloreductases involved in the siderophore-dependent iron uptake system.

The RACE method was used once again, now using 2.3 sequence specific primers. Several fragments were obtained in both iron growth conditions. They showed strong homologies to different sequences in the database, including: a membrane glycoprotein, a putative vacuolar sorting protein, an L-amino acid oxidase, ATPases of several distinct species, different precursors of lignin peroxidases of both *P. chrysosporium* and other white-rot fungal species, and the polyubiquitin 5 of *P. chrysosporium*. However, the iron-regulated expression was confirmed only for the transcript fragment that encodes the polyubiquitin 5.

Finally, a mini-library was constructed with 2,000-3,000 base pairs *Pvu* II fragments of genomic DNA. This range of fragments was selected based on hybridization to the 2.3 partial cDNA sequence. A clone was obtained which showed strong homology to several ABC transporter proteins. Some ABC-protein family members are involved in the siderophore-mediated iron transport in bacteria. The complete sequence of the transcript that encodes the ABC protein of *P. chrysosporium* was obtained and characterized.

INTRODUÇÃO

Por muitos anos, a capacidade de degradar os componentes da madeira foi quase exclusivamente associada à produção de enzimas ligninocelulolíticas extracelulares (Blanchette *et al.*, 1997; Kullmann & Matsumura, 1997; Reddy *et al.*, 1998; Mason *et al.*, 2001; Gelpke *et al.*, 2002), sendo que as enzimas melhor caracterizadas são: as lacases (Guillén *et al.*, 2000), as lignina peroxidases (LiPs) e as manganês peroxidases (MnP) (revisão em Conesa *et al.*, 2002; revisão em Martínez, 2002). Entretanto, apesar dos inúmeros estudos realizados para elucidar os mecanismos pelos quais estas enzimas participam da degradação da madeira, estes processos não são totalmente conhecidos (Sarkanen *et al.*, 1991; Blanchette *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 1998; Xu & Goodell, 2001). Além disso, estudos têm mostrado que em processos de degradação não-erosivos as enzimas extracelulares são muito grandes para passarem pelos poros da parede celular da madeira o que impede o contato direto, no início da degradação, entre estas enzimas e a lignina, principal componente da madeira (Blanchette *et al.*, 1997).

Desta forma, uma hipótese sugerida para explicar a degradação da lignina nos estágios iniciais deste processo seria que as enzimas extracelulares poderiam agir indiretamente através da ativação de compostos de baixa massa molar que por sua vez se difundiriam pela parede celular da madeira iniciando a quebra da celulose e da lignina. Com o início do processo de degradação a porosidade da parede celular aumentaria continuamente até permitir a passagem de proteínas ou agentes da massa molar maiores até as camadas mais internas da madeira (Blanchette *et al.*, 1997; Mester *et al.* 2001; Xu & Goodell, 2001; Hammel *et al.*, 2002).

Em fungos de degradação branca e parda, muitos estudos associam a capacidade de degradar lignina com a produção de compostos de baixa massa molar com características quelantes de metais, entre eles o ferro (Enoki *et al.*, 1997; Goodell *et al.*, 1997; Parra *et al.*, 1998 a, b; Tanaka *et al.*, 1998; Paszczynski *et al.*, 1999; Rodrigues *et al.*, 1999; Xu & Goodell, 2001; Ferraz *et al.*, 2001; Minussi *et al.*, 2001; Milagres *et al.*, 2002; Qian *et al.*, 2002; Hammel *et al.*, 2002).

O ferro é constituinte de inúmeras enzimas com papel crítico no metabolismo do oxigênio, na transferência de elétrons, na síntese de RNA e na eliminação de intermediários de espécies reativas de oxigênio (Crosa, 1997; Moeck & Coulton, 1998). O ferro é usado como

cofator por muitas enzimas e proteínas regulatórias (Venturi *et al.*, 1995). Apesar de ser abundante na natureza na forma Fe(III), é altamente insolúvel em pHs fisiológicos, limitando sua disponibilidade para captação pelos organismos. Para manter o metabolismo celular, os microrganismos desenvolveram diversos mecanismos eficientes de captação seletiva de ferro e de transporte deste para o interior da célula (Hantke, 2001; Kosman, 2003). Entre estes sistemas, está a síntese de compostos de baixa massa molar com alta afinidade frente ao íon, dentre os quais estão os sideróforos (Neilands, 1995). Os sideróforos são compostos capazes de solubilizar íons férricos e transportá-los para dentro da célula (Howard, 1999; Braun & Killmann, 1999; Crosa & Walsh, 2002). Ainda, muitos organismos que não produzem sideróforos, possuem várias rotas de transporte de ferro (férrico e ferroso) que incluem sistemas de transporte de baixa afinidade e inúmeros sistemas de transporte de alta afinidade (Philpott *et al.*, 2002; Kosman, 2003). Grande parte dos genes envolvidos nestes sistemas estão sob o controle de fatores de transcrição ferro-regulados (Hantke, 2001; Crosa & Walsh, 2002; Philpott *et al.*, 2002; Kosman, 2003).

Para o estudo do papel do ferro na regulação da expressão de genes, entre eles os envolvidos na biossíntese e transporte de sideróforos ou de outros quelantes de ferro, em espécies de fungos que degradam madeira, duas espécies de fungos de degradação branca foram utilizadas no presente estudo. Micélio dos fungos *Phanerochaete chrysosporium* e *Lentinula edodes*, foi crescido em duas condições diferenciais de suprimento de ferro(III), ou seja, em presença (90 μ M de FeCl₃) ou ausência do metal no meio de cultivo com o objetivo de induzir e reprimir, respectivamente, a produção de quelantes deste metal.

Desta forma, inicialmente, como será descrito no Capítulo 1, foram feitas curvas de crescimento e de produção de sideróforos, para o estabelecimento do momento de coleta do micélio para armazenagem e posterior utilização.

Para alcançar os objetivos propostos por este estudo, inicialmente duas abordagens foram utilizadas. A primeira baseou-se na metodologia desenvolvida por Liang & Pardee (1992) e Liang *et al.* (1993), denominada *display* diferencial de mRNA (DD), a qual tem por princípio observar genes expressos de forma diferencial em resposta à diferentes fatores externos através de uma reação de transcrição reversa utilizando *primers* randômicos ancorados por *primers* oligo-dT usando como molde o RNA total ou mRNAs. Os resultados

obtidos, utilizando esta abordagem estão descritos no Capítulo 2 sob a forma de artigo que foi publicado na revista *Environmental Microbiology*. Cabe ressaltar, que, inicialmente, para os experimentos realizados nesta etapa também se utilizou o fungo *L. edodes*. Entretanto, devido ao grande número de bandas isoladas nos experimentos com *P. chrysosporium* e a problemas na obtenção de bandas igualmente representativas como observado para *P. chrysosporium* na amplificação do cDNA de *L. edodes* com os *primers* ancoradores oligo-dT juntamente com o randômico OPJ-01 (dados não mostrados), decidiu-se retirar este último fungo desta etapa do trabalho.

A segunda abordagem utilizada neste estudo baseou-se no procedimentos utilizados por Haas *et al.* (1997), em *Penicillium chrysogenum*, para o isolamento do gene *SREP* que codifica um fator de transcrição GATA. Desta forma, foram utilizados *primers* degenerados desenhados com base na sequência de dois domínios altamente conservados nas proteínas da família GATA. Juntamente com o uso destes *primers* foram sintetizados cDNAs pelo método RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) o que permite com maior eficiência a obtenção de fitas de cDNA mais completas (Frohman *et al.*, 1988; Schaefer, 1995). Com esta abordagem, como será descrito no Capítulo 3, foi obtido o fragmento de cDNA que foi clonado e denominado de fragmento 2.3. Este fragmento foi isolado de micélio crescido com suprimento de ferro(III), cuja sequência de aminoácidos deduzida apresentou identidade de 54% com as proteínas SREA e SREP, e de 48% com SRE, envolvidas na regulação da biossíntese de sideróforos dos fungos *Aspergillus nidulans*, *P. chrysogenum* e *Neurospora crassa*, respectivamente.

Com o isolamento do fragmento 2.3 de *P. chrysosporium*, o qual poderia ser um candidato ao gene regulador de síntese de sideróforos pelas condições de expressão em alta concentração de ferro e homologia com proteínas envolvidas na regulação da biossíntese de sideróforos de outros fungos, o passo seguinte foi buscar o isolamento e a caracterização do gene completo. Para tanto, foram desenhados *primers* específicos com base na sequência do fragmento 2.3 e novamente foram sintetizados cDNAs pelo método RACE, como será descrito no Capítulo 4. Embora tenham sido isolados fragmentos de cDNA que mostraram homologias com genes regulados por ferro, esta metodologia não permitiu isolar nenhum fragmento que mostrasse homologia com genes que codificam proteínas envolvidas na síntese de sideróforos em fungos ou bactérias.

Frente aos resultados dos experimentos descritos no Capítulo 4, realizou-se um *Southern blot* utilizando DNA genômico de *P. chrysosporium* que foi hibridizado utilizando como sonda o fragmento 2.3. Esta análise foi realizada para confirmar se o transcrito representado pelo fragmento 2.3 reconhecia uma sequência no DNA genômico e não era produto de um artefato resultante da amplificação. Com isso foi possível observar uma clara hibridização com fragmentos de DNA genômicos de vários tamanhos dependendo da enzima de restrição utilizada para digerir o DNA de *P. chrysosporium* (Capítulo 5). Com este resultado, o passo seguinte foi construir um mini-banco genômico com fragmentos de DNA de 2.000 a 3.000 pb gerados pela enzima *Pvu* II que foram clonados no vetor pUC18. A representatividade da biblioteca foi de cerca de 2.900 clones. Após a varredura dos clones por *Colony blotting* usando-se o fragmento 2.3 como sonda foram isolados cerca de 38 clones. Dezoito fragmentos clonados foram sequenciados, porém não se verificou homologia com os genes envolvidos na biossíntese de sideróforos de fungos, homologia esta inicialmente observada para o fragmento 2.3. Embora o gene homólogo aos *SREA*, *SREP* e *SRE* não tenha sido isolado, como era esperado, com este experimento isolou-se parte de um gene de *P. chrysosporium* que mostrou grande homologia com o transportador ABC (*ATP binding cassette*) putativo de *N. crassa*, o gene *YORI*. Os procedimentos utilizados, na construção do mini-banco bem como nas etapas seguintes até a obtenção da sequência de 2.293 bases do fragmento clonado (clone P14A1) homólogo à *YORI*, estão descritos no Capítulo 5. Ainda, neste capítulo são descritos os experimentos realizados para isolar o transcrito completo do gene ABC de *P. chrysosporium*.

Em resumo, este trabalho apresentado em cinco capítulos, teve como objetivo principal o isolamento de genes envolvidos na via biossintética e de transporte de sideróforos produzidos por fungos que degradam madeira, bem como de genes envolvidos na regulação dependente de ferro destas e de outras rotas metabólicas importantes para os processos celulares, buscando contribuir para o conhecimento destas vias nos fungos em questão.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Fungos ligninolíticos

A degradação biológica da madeira envolve enzimas específicas que são secretadas por microrganismos que reagem com os componentes da parede celular das fibras vegetais, sendo que os principais organismos que degradam lignina na natureza são os fungos filamentosos.

Os fungos que degradam madeira são basicamente divididos em três categorias principais, definidas de acordo com as características dadas a mesma durante o processo de degradação. Os fungos de degradação branda (*soft-rot*), que agrupam espécies pertencentes às classes Ascomicotina e Deuteromicotina, recebem essa denominação por produzirem um amolecimento nas camadas superficiais da parede da célula vegetal sendo que ocorre somente uma baixa taxa de degradação de polissacarídeos e uma degradação limitada da lignina (Kirk & Farrel, 1987; Blanchete, 1991). Os fungos de degradação parda (*brown-rot*) são da classe Basidiomicotina e degradam principalmente os polissacarídeos da parede celular com limitada degradação da lignina (Crowling, 1961). Finalmente, os fungos de degradação branca (*white-rot*) que pertencem às classes Basidiomicotina e Ascomicotina apresentam uma capacidade muito grande de degradar todos os componentes da madeira, inclusive a lignina (Ander & Eriksson, 1977) através da produção de enzimas e/ou compostos não enzimáticos que oxidam compostos fenólicos, muitos deles relacionados com a lignina (Eriksson *et al.*, 1990).

2. *Phanerochaete chrysosporium* e *Lentinula edodes*

Entre os fungos de degradação branca, a espécie *Phanerochaete chrysosporium* é a mais extensivamente estudada devido a sua eficiência em degradar lignina (Yadav & Loper, 2000; Mester *et al.*, 2001; Hirai *et al.*, 2002) e uma variedade de poluentes ambientais (Cameron *et al.*, 2000; Duran *et al.* 2002; Bending *et al.*, 2002) durante o metabolismo secundário (Cameron *et al.*, 2000). Desta forma, o fungo *P. chrysosporium* é considerado um organismo modelo para o estudos destes processos (Lamar *et al.*, 1995; Schick Zapanta & Tien, 1997; Scheel *et al.*, 2000).

O fungo *P. chrysosporium* pertence à Sub-divisão Basidiomicota, Classe Himenomicete, Sub-Classe Homobasidiomicete, Família Aphiloforales e Ordem Corticiacea. Este fungo degrada todos os componentes da ligninocelulose (lignina, celulosas e

hemicelulose), sendo que a degradação da lignina é uma resposta metabólica para a deficiência nutricional de carbono, nitrogênio e de enxofre (Zhang *et al.*, 1991; Broda *et al.*, 1995). O sistema ligninolítico de *P. chrysosporium* consiste principalmente das enzimas extracelulares lignina peroxidases (LiPs), manganês peroxidases (MnPs) e da enzima glioxal oxidase (GLOX) produtora de H₂O₂ (Gold & Alic, 1993; Janse *et al.*, 1998). As lacases, uma classe importante de enzimas ligninolíticas extracelulares, não apresentam um papel fundamental na degradação de lignina por *P. chrysosporium* (Scheel *et al.*, 2000). Estudos recentes têm sugerido o envolvimento da celobiose desidrogenase (oxidoreductase) na degradação da lignocelulose por *P. chrysosporium* (Henriksson *et al.*, 2000; Cameron & Aust, 2001; Mason *et al.*, 2002; Raíces *et al.*, 2002), entretanto não são completamente conclusivos e estudos adicionais são necessários para confirmar o papel destas enzimas na degradação da madeira em condições naturais (Mason *et al.*, 2002). As lignina peroxidases de *P. chrysosporium* são codificadas por no mínimo 10 genes intimamente relacionados e agrupados em três grupos de ligação (Martínez, 2002; Conesa *et al.*, 2002) enquanto que as manganês peroxidases produzidas por este fungo são codificadas por três genes não ligados conhecidos como genes *mnp* (Janse *et al.*, 1998; Gettemy *et al.*, 1998).

O basidiomiceto *Lentinula edodes* é um fungo de degradação branca, comumente conhecido como *shiitake* e pertence à Sub-divisão Basidiomycota, Classe Himenomicete, Sub-Classe Homobasidiomicete, Família Agaricales e Ordem Tricolomatacea. Diversos estudos foram realizados para obter um maior desenvolvimento das culturas deste fungo para comercialização. Entretanto, poucos estudos sobre *L. edodes* tem focado a produção de enzimas ou compostos envolvidos na degradação da lignina e da celulose. Neste fungo, foi sugerido que as lacases possuem um papel importante na degradação de lignocelulose (Zhao & Kwan, 1999). Por outro lado, em um estudo desenvolvido por Forrester *et al.* (1990), foi isolada uma proteína ferro-heme cuja sequência de aminoácidos N-terminal mostrou homologia com sequências de manganês peroxidases de *P. chrysosporium*. Ainda, foi verificado que esta enzima denominada MnP1 foi capaz de oxidar lignina e compostos modelos de lignina em presença de manganês e peróxido de hidrogênio. Em um estudo recente, utilizando a metodologia de RNA *fingerprinting* por PCR com *primers* arbitrários (RAP-PCR), vários fragmentos de cDNA foram isolados a partir de RNA extraído de micélio, de primórdio de corpos frutíferos, de corpos frutíferos jovens e de corpos frutíferos maduros

de *L. edodes* crescido em um composto de serragem. Entre os fragmentos isolados, treze produtos de RAP-PCR mostraram padrão diferencial verificado por *Northern blot* e foram homólogos com os mais diversos genes, entretanto, nenhum gene relacionado com o metabolismo secundário foi encontrado (Leung *et al.*, 2000).

3. Lignina

A lignina é um dos biopolímeros mais abundantes na Terra sendo um dos principais componentes da parede celular e da lamela média nos tecidos da madeira (Henriksson *et al.*, 2000) conferindo-lhe rigidez e fornecendo-lhe resistência e proteção contra a biodegradação (Eriksson *et al.*, 1990, citado por Ander & Marzullo, 1997). Este polímero possui uma estrutura tridimensional altamente ramificada e heterogênea formada por unidades de fenil-propano as quais são interligadas através de diferentes pontes (Ander & Marzullo, 1997), tornando-a um biopolímero aromático complexo, extremamente resistente à degradação. Uma vez que a lignina é interconectada por pontes estáveis carbono-carbono e éter, os mecanismos envolvidos na ligninólise devem ser oxidativos (Hammel, 1997). Apenas uma estreita gama de organismos se mostram eficientes na sua degradação, dentre estes, os fungos basidiomicetes são os que estão melhor caracterizados.

4. Enzimas envolvidas na degradação da madeira

A capacidade apresentada pelos fungos ligninolíticos em degradar os diferentes componentes da parede celular da madeira tem sido atribuída a sistemas formados por enzimas extracelulares por eles produzidas (Kullmann & Matsumura, 1997; Reddy *et al.*, 1998; Mason *et al.*, 2001; Gelpke *et al.*, 2002). Os tipos de enzimas ligninolíticas melhor caracterizados para diversas espécies de fungos são as lacases (Guillén *et al.*, 2000; D' Souza *et al.*, 1996; Zhao & Kwan, 1999), as lignina peroxidases (LiPs) e as manganês peroxidases (MnP) (Li *et al.*, 1995; Hirai *et al.*, 2002; Mester *et al.*, 2001; Mäkelä *et al.*, 2002; Scheel *et al.*, 2000; Conesa *et al.*, 2002; Hirai *et al.*, 2002). Outros participantes do sistema de degradação da lignina são compostos não-enzimáticos tal como o álcool veratrílico (Gelpke *et al.*, 2002; Baciocchi *et al.*, 2002; Conesa *et al.*, 2002).

As LiPs formam uma família de proteínas extracelulares do tipo heme glicosilases com

massas molares que variam de 38 a 43 kDa que utilizam peróxido de hidrogênio para catalisar a oxidação de uma grande variedade de substratos orgânicos ou inorgânicos, entre estes a lignina (Banci, 1997). Vários estudos revelam que os genes *lip* de *P. chrysosporium* são expressos quando o fungo é crescido em meio com quantidades limitantes de carbono, nitrogênio ou enxofre (Kirk & Farrell, 1987).

As MnPs reduzem peróxido de hidrogênio e oxidam Mn(II) em Mn(III), sendo que o Mn(III) é capaz de realizar a oxidação da lignina (Li *et al.*, 1995).

As lacases são glicoproteínas que contém cobre, as quais reduzem Cu(II) durante a oxidação de uma ampla variedade de substratos tais como fenóis e aminas aromáticas (Rodríguez *et al.*, 2003).

Apesar da intensiva investigação feita nas últimas duas décadas, que levaram ao conhecimento das inúmeras enzimas e compostos envolvidos nos processos ligninolíticos, o mecanismo detalhado da degradação da lignina ainda não foi elucidado (Sarkanen *et al.*, 1991; Blanchette *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 1998; Mester *et al.*, 2001). Muitos estudos mostram que em processos degradativos não-erosivos os três tipos principais de enzimas ligninolíticas são demasiadamente grandes para penetrarem a parede celular da madeira devido ao pequeno tamanho dos poros, portanto o contato direto das enzimas com a lignina nos estágios iniciais da degradação não é possível (Blanchette *et al.*, 1997; Xu & Goodell, 2001; Mester *et al.* 2001). Neste caso, uma hipótese que se sugere para explicar a degradação da lignina nos estágios iniciais do processo degradação é que as enzimas extracelulares poderiam agir indiretamente através da ativação de compostos de baixa massa molar que por sua vez se difundiriam pela parede celular da madeira iniciando a quebra da celulose e da lignina. Com o início do processo de degradação, a porosidade da parede celular aumentaria continuamente até permitir a passagem de proteínas ou agentes da massa molar maiores até as camadas mais internas da madeira (Blanchette *et al.*, 1997; Mester *et al.* 2001). Portanto, devem haver mecanismos cooperativos os quais envolvem inicialmente compostos de baixa massa molar tais como quelantes de metais ou mediadores enzimáticos capazes de precederem as enzimas nos micro-espacos da estrutura da lignocelulose e promoverem então uma abertura na parede celular (Paszczynski *et al.* 1988; Daniel, 1994; Rodríguez *et al.*, 2003).

5. Compostos de baixa massa molar

Vários compostos de baixa massa molar (300-5000 Da) tem sido descritos em fungos que degradam madeira, entre eles compostos quelantes de metais. O papel destes compostos na biodegradação da madeira tem sido repetidamente confirmado através de validação experimental tanto para fungos de degradação branca (Parra *et al.*, 1998a, b; Rodríguez *et al.*, 1999; Ferraz *et al.*, 2001; Minussi *et al.*, 2001; Milagres *et al.*, 2002) como para fungos de degradação parda (Goodell *et al.*, 1997; Enoki *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 1998; Paszczynski *et al.*, 1999; Xu & Goodell, 2001; Qian *et al.*, 2002). Entre os compostos de baixa massa molar com características quelantes de metais, os compostos que quelam ferro têm sido bastante estudados (Rodríguez *et al.*, 2003). Estes quelantes têm uma alta afinidade por ferro e são capazes de reduzir íons férricos em íons ferrosos (Xu & Goodell, 2001). O ferro reduzido pode então reagir com o peróxido de hidrogênio em uma reação do tipo Fenton para produzir radicais hidroxila, os quais são capazes de reagir tanto com a lignina como com a celulose da parede celular da madeira (Goodell *et al.* 1997; Qian *et al.*, 2002).

Em fungos de degradação branca e de degradação parda, muitos estudos associam a eficiência em degradar lignina com a produção de compostos de baixa massa molar com características quelantes de metais, entre eles o manganês (Akhtar *et al.*, 1997), o cobre (Watanabe *et al.*, 1998) e o ferro (Enoki *et al.*, 1997; Goodell *et al.*, 1997; Parra *et al.*, 1998a, b; Tanaka *et al.*, 1998; Paszczynski *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 1999; Xu & Goodell, 2001; Ferraz *et al.*, 2001; Minussi *et al.*, 2001; Milagres *et al.*, 2002; Qian *et al.*, 2002).

Inicialmente muitos estudos propunham que os sideróforos pudessem exercer um papel importante na degradação da lignina (Jellison *et al.*, 1991; Rodríguez *et al.*, 1997; Parra *et al.*, 1998a, b, Machuca *et al.*, 1999). Sideróforos são definidos como agentes quelantes de massa molar relativamente baixa, específicos para o íon férrico e com alto coeficiente de afinidade, produzidos por fungos e bactérias em situação de carência de ferro, cuja função é seqüestrar o ferro do ambiente e torná-lo disponível à célula microbiana (Howard, 1999; Braun & Killmann, 1999; Crosa & Walsh, 2002). Entretanto decorridos vários anos, verificou-se que apesar dos compostos quelantes de ferro produzidos por fungos que degradam madeira mostrarem semelhança indubitável com sideróforos de bactérias e de fungos não que não possuem capacidade de degradar madeira, os compostos de quelantes de baixa massa molar secretados por fungos lignocelulolíticos podem não ser necessariamente sideróforos como

inicialmente de pensava (Rodríguez *et al.*, 2003; Goodell, 2003).

Vários estudos têm proposto a participação de radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$) na degradação da madeira por fungos de degradação parda e em menor extensão para fungos de degradação branca (Tornberg & Olsson, 2002). Estes radicais agem sobre os diferentes componentes da madeira participando da erosão da parede celular da madeira e desta forma permitem o acesso das enzimas extracelulares aos componentes do tecido da madeira no processo de degradação (Watanabe *et al.*, 2002). Em sistemas biológicos, os radicais hidroxila são produzidos geralmente durante a reação de Fenton (Jensen *et al.*, 2001). Entretanto, para utilizar o $\bullet\text{OH}$ como um oxidante o fungo precisa reduzir o Fe(III) extracelular e produzir H_2O_2 extracelular. Um modelo proposto por Goodell *et al.* (1997), sugere que os compostos quelantes de metais de baixa massa molar produzidos pelos fungos de degradação parda não somente possuem uma forte afinidade por Fe(III) como mediam o ciclo de redução de ferro. Ainda segundo estes autores, o Fe(II) resultante pode reagir com o peróxido de hidrogênio e produzir espécies ativas de oxigênio envolvidas na degradação da madeira por estes fungos (Xu & Goodell, 2001). O $\bullet\text{OH}$ pode transformar as camadas da parede celular causando a quebra das moléculas de celulose e de lignina, e desta forma permite que as celulasas e as fenol oxidases possam ter contato direto com os componentes da madeira. Além disso, o $\bullet\text{OH}$ pode modificar a lignina, resultando em uma estrutura fenólica alterada que é suscetível ao ataque de MnP e de lacases, em adição à destruição da estrutura cristalina da celulose, tornando assim a parede celular susceptível à hidrólise (Tanaka *et al.*, 1998). Atualmente é bem conhecido que os fungos de degradação parda utilizam mecanismos do tipo Fenton envolvendo a participação de quelantes de ferro para realizar a degradação de lignina, entretanto um processo similar em fungos de degradação branca ainda não foi elucidado (Rodríguez *et al.*, 2003).

Para os fungos de degradação branca *Trametes versicolor* (Tanaka *et al.*, 1998), *Irpex lacteus* (Tanaka *et al.*, 1991) e *P. chrysosporium* (Tanaka *et al.*, 1996), foi observada a produção de compostos de baixa massa molar (M_r 1000-5000) que catalisam uma reação de redução entre oxigênio molecular e um elétron doador para produzir radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$) via O_2^- e peróxido de hidrogênio (Tanaka *et al.*, 1998). Além disso, foi verificado que estes compostos reduzem Fe(III) a Fe(II) e ligam fortemente Fe(II) (Tanaka *et al.*, 1996).

6. Ferro

O ferro é um dos metais mais abundantes na natureza e o requerimento deste metal é praticamente universal para todas as células vivas, devido a sua importância para o metabolismo celular. O ferro é um constituinte de enzimas com papel crítico no metabolismo do oxigênio, na transferência de elétrons, na síntese de RNA e na eliminação de intermediários de espécies reativas de oxigênio (Crosa, 1997; Moeck & Coulton, 1998; Kim *et al.*, 2002). O ferro é empregado como um cofator por muitas enzimas metabólicas e proteínas regulatórias devido ao fato de existir em dois estados de oxidação estáveis, denominados estado ferroso Fe(II) e estado férrico Fe(III) (Venturi *et al.*, 1995). Em fungos que degradam madeira muitas enzimas que participam do processo degradativo tem o ferro como um componente do sítio ativo. Entre estas estão a lignina peroxidase, a manganês peroxidase e a celobiose desidrogenase (Rodríguez *et al.*, 2003). Apesar de ser abundante na natureza na forma Fe(III), é altamente insolúvel em pHs fisiológicos, limitando sua disponibilidade para os organismos (Hartwig & Loepper, 1993; Moeck & Coulton, 1998). Para manter o metabolismo celular e por outro lado, para evitar altas concentrações de ferro no interior da célula, o que causaria grande toxicidade devido a alta reatividade do íon e, desencadearia o estresse oxidativo, os microrganismos desenvolveram diversos mecanismos eficientes de captação seletiva de ferro, de transporte para o interior da célula, bem como de seu armazenamento (Hantke, 2001; Kosman, 2003).

7. Sistemas de aquisição de ferro em bactérias

Em condições de carência de ferro, o principal mecanismo usado pelas bactérias para aquisição do metal baseia-se na síntese de uma variedade de compostos de baixa massa molar com alta afinidade frente ao íon, denominados sideróforos. Estes compostos apresentam três tipos estruturais principais: hidroxamatos, catecolatos e α -hidroxicarboxilatos (Braun & Killmann, 1999). Ainda, muitos microorganismos possuem a capacidade de utilizar sideróforos produzidos e liberados no meio extracelular por outras bactérias ou até por fungos, em adição aos sideróforos sintetizados por eles próprios (Braun & Braun, 2002a).

Atualmente, sabe-se que a proteína regulatória Fur (*ferric uptake regulation*) ou proteínas do tipo-Fur regulam a produção de quelantes de ferro em muitas espécies de

bactérias (Raymond *et al.*, 2003). Estudos com mutantes *fur* em *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* permitiram a caracterização da proteína repressora Fur, a qual regula os genes envolvidos na captação de ferro e na biossíntese de sideróforos em resposta à concentração de ferro na célula. Análises de diferentes promotores regulados por Fur permitiram definir a sequência consenso entre Fur e a sequência de ligação com Fe(II), conhecida como Fur *box*. Desta forma, Fur em associação com Fe(II) reprime a transcrição dos genes envolvidos na captação de ferro. Geralmente, Fur reprime a transcrição de genes envolvidos no metabolismo do ferro, no metabolismo geral, nas respostas a estresses, na patogeneicidade e em outros processos (Dubrac & Touati, 2002). Sequências similares são encontradas na região promotora de muitos genes regulados por ferro em outras bactérias (Hantke, 2001). Um segundo gene envolvido na regulação da captação de ferro foi descrito. Este gene codifica a proteína repressora DtxR (*diphtheria toxin regulator*) a qual não é um regulador do tipo-Fur. A produção da proteína DtxR e de proteínas do tipo-DtxR foi observada em algumas bactérias Gram-positivas, tais como a micobactéria, o estreptomices e a corinobactéria (Raymond *et al.*, 2003). Nestas bactérias, as quais possuem um alto conteúdo de guanina e citosina (GC) em seu DNA, as proteínas do tipo DtxR regulam um conjunto de genes similares àqueles regulados por Fur em muitas bactérias Gram-negativas ou outras bactérias Gram-positivas cujo conteúdo de GC seja baixo. Ainda, a sequência consenso de ligação no DNA para DtxR difere da sequência do Fur *box*. Entretanto, em organismos que possuem a regulação de ferro dependente de Fur, os membros da família DtxR regulam o transporte de manganês. A proteína Fur é regulada por dois reguladores da resposta a estresse oxidativo sendo que o ferro e a geração de radicais de oxigênio são a base desta regulação (Hantke, 2001). Em *E. coli*, a síntese das superóxido dismutases citoplasmáticas MnSOD e FeSOD é controlada por Fur, e a expressão de *fur* é regulada por dois sistemas envolvidos na regulação do estresse oxidativo, o OxyR e o SoxRS (Dubrac & Touati, 2002). Segundo Zheng *et al.* (1999) o peróxido de hidrogênio ativa a expressão do fator de transcrição OxyR e a expressão de SoxRS é ativada por compostos geradores de superóxido. Ainda, estudos têm reportado alguns exemplos de ativação da expressão mediada por Fur. Entre os genes estudados estão os genes *ftn* e *bfr* (armazenamento de ferro), *acnA* e *fumA* (Ciclo de Krebs) e *sodB* (Dubrac & Touati, 2002).

Diferentes espécies e cepas de bactérias podem utilizar mais de um tipo de sideróforo na captação de ferro(III) do ambiente. Desta forma, o espectro de sideróforos que uma

determinada cepa pode usar é determinado pela especificidade do sistema de transporte do complexo ferro-sideróforos que ele forma (Braun & Braun, 2002a).

Em bactérias Gram-negativas o ferro(III) complexado com compostos ocasiona um problema para a aquisição de ferro por estas bactérias, uma vez que os complexos de ferro são muito grandes para serem transportados através das porinas da membrana externa. As bactérias resolveram este problema fazendo o transporte via receptores de membrana externa de alta afinidade para o complexo com íons férricos, ou ainda, através de um sistema de membrana constituído de proteínas redutoras as quais removem o ferro dos complexos e transportam-no através da membrana externa. O transporte através da membrana citoplasmática é subsequentemente mediado por transportadores ABC (*ATP binding cassette*) (van Vliet *et al.*, 2002). Em bactérias Gram-positivas, as quais contêm uma parede celular permeável, as fontes de ferro estão em contato direto com a membrana citoplasmática. Como amplamente reportado, o transporte através destas membranas é catalisado por transportadores ABC, que formam o sistema de transporte mais utilizado para a captação dos mais variados nutrientes em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (Braun & Braun, 2002b).

Em diferentes espécies de bactérias, três proteínas da membrana externa envolvidas no transporte de complexos de sideróforos-ferro(III) têm sido extensivamente estudadas sendo estas, a FhuA que transporta ferricromo, um sideróforo do tipo hidroxamato, a proteína FepA que transporta o complexo enterobactina-ferro(III), um sideróforo do tipo catecolato e a FecA a qual transporta citrato férrico. Estudos mostram que estas proteínas possuem uma região na extremidade N-proximal denominada TonB *box* que interage com a proteína TonB (Moeck & Coulton, 1998; Braun & Braun, 2002b). A liberação do sítio de ligação e o transporte através da membrana externa consome energia, como não existe fonte de energia na membrana externa, esta é fornecida pela *proton motive force* da membrana citoplasmática. Desta forma, para suprir a necessidade de energia as bactérias desenvolveram um sistema que fornece energia para o transporte através da membrana externa. Este tipo de sistema de transporte é denominado transporte ativo da membrana externa TonB dependente (Braun & Braun, 2002a, b). O sistema TonB é formado pelas proteínas citoplasmáticas TonB, ExbB e ExbD que interagem umas com as outras e formam um complexo que provavelmente responde ao *proton motive force*. TonB interage preferencialmente com proteínas de transporte da membrana externa que estão carregadas com substrato. As mudanças conformacionais de TonB induzidas

pela *proton motive force* causam uma mudança conformacional nas proteínas de transporte as quais liberam o substrato dos seus sítios de ligação e iniciam sua translocação dentro do periplasma. Para o transporte do ferricromo e de outros compostos de baixa massa molar uma pequena transição no domínio globular de FhuA ou FepA é suficiente para conectar a cavidade externa, onde está o substrato, com a região que está aberta ao periplasma. O ferricromo pode difundir-se através do canal aberto. A ligação e liberação seqüencial do ferricromo acelera a difusão e facilita o movimento unidirecional dentro do periplasma (Braun & Braun, 2002a). Uma vez que o complexo ferro(III)-sideróforo atravessa a membrana externa este é translocado para dentro do citoplasma via um sistema de transporte ABC (Raymond *et al.*, 2003). Como exemplo deste transporte via proteínas ABC, podemos citar o transporte do ferricromo que envolve a proteína periplasmática de ligação FhuD, a proteína de membrana citoplasmática FhuB a qual é altamente hidrofóbica, e a proteína citoplasmática FhuC (ATPase) associada com FhuB. Neste sistema o ATP serve como fonte de energia (Braun & Braun, 2002a).

Outro exemplo de um sistema de transporte de sideróforos em bactérias é o responsável pelo transporte da enterobactina, esquematizado na Figura 1.

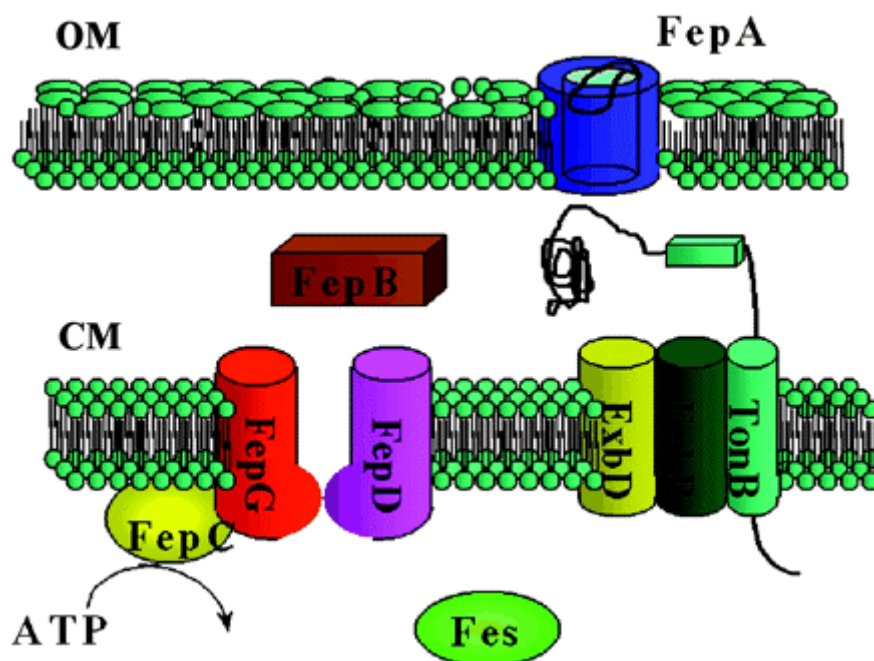


Figura 1. Representação esquemática da topologia transmembrana das proteínas envolvidas na captação do complexo ferro-enterobactina (reproduzido de Raymond *et al.*, 2003).

O mecanismo para o transporte do complexo ferro(III)-enterobactina (FeEnt) baseia-se no fato de que em um estado de deficiência de ferro, receptores de ferro proliferam entre as proteínas da membrana externa. A proteína receptora FepA é uma proteína de canal altamente específica que reconhece o domínio de ligação ao ferro e os domínios de ligação amida do complexo FeEnt. O movimento de abertura do canal (FepA) é traduzido pelo complexo formado pelas proteínas TonB-ExbB-ExbD as quais estão ancoradas na membrana citoplasmática. FepB, uma proteína periplasmática carrega o complexo FeEnt até os poros da membrana citoplasmática formados pelas proteínas transmembrana FepD e FepG. Estudos sugerem que a proteína citoplasmática FepC, a qual é uma ATPase, fornece energia para auxiliar a captação através da membrana interna. Por último uma esterase citoplasmática que tem o complexo FeEnt como um de seus substratos, codificada pelo gene *fes*, catalisa uma clivagem hidrolítica que leva à liberação intracelular do ferro (Raymond *et al.*, 2003).

Ainda em bactérias a captação de ferro pode se dar diretamente pela absorção de ferro(II), o transporte dos íons ferrosos requer somente um transportador de membrana citoplasmática. O primeiro sistema específico de transporte de íons ferrosos identificado em bactérias foi o sistema de transporte Feo de *E. coli*. Este sistema consiste do *operon feoAB*, o qual codifica uma pequena proteína (FeoA) de função desconhecida e a proteína transportadora FeoB. A proteína FeoB é uma proteína da membrana citoplasmática de aproximadamente 70 kDa, a qual usa a hidrólise de ATP e GTP para fornecer energia para o transporte. Homólogos a proteína FeoB têm sido encontrados em muitos genomas de bactérias (Kammler *et al.*, 1993 citado por van Vliet *et al.*, 2002).

8. Sistemas de aquisição de ferro em fungos

Em fungos, trabalhos sobre os mecanismos envolvidos na captação de ferro para as diferentes espécies têm sido mais difíceis dada a complexidade destes organismos em relação às bactérias em geral. Contudo, inúmeros estudos têm avançado neste campo sendo que para a maioria dos fungos dois tipos de mecanismos de aquisição de ferro têm sido estabelecidos ou inferidos a partir da análise proteômica: um destes mecanismos depende da redução extracelular do Fe(III) a Fe(II) e o outro depende da internalização do complexo ferro(III)-sideróforo (Kosman, 2003).

O sistema mais conhecido de captação de ferro dependente de sideróforo é o do fungo

fitopatogênico *Ustilago maydis* (Budde & Leong, 1989), que sintetiza os sideróforos ferricromo e ferricromo A, os quais são hexapeptídios cíclicos que contêm três resíduos de aminoácido δ -N-hidroxiornitina e três glicinas (ferricromo) ou duas serinas e uma glicina, no caso do ferricromo A (Wang *et al.*, 1989). Para este fungo, três genes envolvidos na biossíntese destes sideróforos foram caracterizados, sendo os genes denominados *sid1* (Wang *et al.*, 1989; Mei *et al.*, 1993; Leong & Winkelmann, 1998), *urbs1* (Voisard *et al.*, 1993; An *et al.*, 1997a, b) e *sid2* (Yuan *et al.*, 2001). O gene *sid1* codifica a enzima L-ornitina N⁵-oxigenase, a qual catalisa a hidroxilação da L-ornitina, composto precursor dos sideróforos (Wang *et al.*, 1989). A sequência de aminoácido predita para *sid1* mostrou identidade de 35% com 124 aminoácidos na porção N terminal da lisina N⁶-hidroxilase de *Escherichia coli*, enzima que catalisa a hidroxilação de lisina, que por sua vez participa do primeiro passo da biossíntese de aerobactina (Mei *et al.*, 1993). O gene *sid2* codifica uma peptídio-sintetase não ribossômica, a qual se sugere que esteja envolvida na síntese de um dos tripeptídeos componentes do ferricromo, e está localizado a 3,7 Kb à montante do gene *sid1*, localizando-se no *cluster* de genes que codificam para a síntese de ferricromo (Yuan *et al.*, 2001). O gene *urbs1* (*U. maydis* regulator of biosynthesis of siderophore) codifica um fator de transcrição da família GATA que regula negativamente a expressão dos genes *sid1* e *sid2*, sendo o gene *urbs1* regulado por ferro.

Dois mecanismos de regulação têm sido sugeridos para explicar através dos dados disponíveis, como Urbs1 media a regulação do gene *sid1* de um sítio remoto do ponto de início da transcrição. No primeiro, Urbs1 em presença de ferro interagiria com um sítio de alta afinidade e outro de baixa afinidade para formar um *loop* na região promotora do gene *sid1*. A formação do *loop* poderia também envolver as sequências GATA no primeiro *intron*. O segundo modelo postula a ligação de Urbs1 a um elemento responsivo a ferro e possivelmente a outros sítios na cromatina organizadora do promotor de *sid1* impedindo então a ligação de ativadores ou outros fatores requeridos para transcrição de *sid1* (Leong & Winkelmann, 1998).

Genes homólogos ao gene *urbs1*, codificando fatores de transcrição da família GATA, foram isolados em diversos fungos filamentosos. Os genes *SRE* (*siderophore regulator element*), *SREP* e *SREA* foram caracterizados respectivamente em *Neurospora crassa* (Zhou *et al.*, 1998; Zhou & Marzluf, 1999; Harrison & Marzluf, 2002), *Penicillium chrysogenum* (Haas

et al., 1997) e *Aspergillus nidulans* (Haas *et al.*, 1999). A comparação entre as seqüências das proteínas Urbs1, SREP, SRE e SREA mostrou a existência de homologia entre elas. Os genes *Urbs1*, *sreA*, *sreP* e *sre* possuem dois motivos dedo de zinco característicos dos fatores de transcrição da família GATA (Harrison & Marzluf, 2002). Ainda, a comparação das seqüências nucleotídicas dos genes que codificam estas proteínas mostrou que todos os genes exceto o *urbs1* possuem dois *introns* cuja posição é conservada (Haas *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 1998; Zhou & Marzluf, 1999; Haas *et al.*, 1999).

O papel do ferro na regulação da transcrição dos fatores GATA dos diferentes fungos não foi totalmente elucidado (Zhou *et al.*, 1998; Zhou & Marzluf, 1999; Haas *et al.*, 1999). Para *Ustilago* foi proposto que o ferro pode modular a expressão dos genes de sideróforos em um ou mais níveis. O ferro pode servir como um correpressor dos genes regulados por Urbs1 e/ou como um efetor fisiológico que afeta indiretamente a expressão dos genes de sideróforos, alterando a estrutura e/ou localização celular de Urbs1 ou outros fatores desconhecidos envolvidos na regulação gênica dos sideróforos (Leong & Winkelmann, 1998). Também para os fatores GATA, SRE e SREA, a expressão regulada por ferro foi atribuída a um mecanismo de regulação pós-transcricional envolvido na ativação da função de repressor destes fatores (Zhou *et al.*, 1998; Zhou & Marzluf, 1999; Haas *et al.*, 1999).

Outro fungo que têm sido extensamente estudado, com o intuito de se entender melhor os mecanismos relacionados à captação de ferro, é o *Saccharomyces cerevisiae* (Andrews *et al.*, 1999). Sabe-se que *S. cerevisiae* não sintetiza sideróforos, porém este fungo conservou geneticamente a capacidade de transportar sideróforos sintetizados por outros microrganismos (Heymann *et al.*, 2000a). Para tanto, este fungo possui dois sistemas de alta afinidade distintos (Kim *et al.*, 2002; Philpott *et al.*, 2002; Kosman, 2003).

Um dos sistemas de alta afinidade depende de uma família de transportadores homólogos que pertencem à superfamília de facilitadores principais (MFS-*major facilitator superfamily*) também denominada família de transportadores de sideróforos (SIT-*siderophore iron transporter*) (Heymann *et al.*, 2000b). Os transportadores MFS atuam através de um único polipeptídeo de membrana que transporta pequenas moléculas via mecanismos uniporte, simporte ou antiporte em resposta a um gradiente quimiosmótico (Heymann *et al.*, 2000a).

Os genes que codificam os transportadores SIT ou MFS são expressos como parte de um *regulon* (Rutherford *et al.*, 2001) e são chamados de *ARN1*, *ARN2* (também *TAF1*), *ARN3*

(também *STII*) e *ARN4* (também *ENBI*). Estes transportadores são expressos em vesículas intracelulares e cada transportador *ARN* possui especificidade para cada uma das diferentes classes de sideróforos, sendo que aparentemente esta especificidade é dependente do *background* genético das células (Yun *et al.*, 2001; Lessuisse *et al.*, 2001; Philpott *et al.*, 2002; Kosman, 2003).

O segundo sistema de alta afinidade de captação de ferro consiste de um processo de dois passos que inicia com a redução dos íons férricos complexados com os sideróforos a íons ferrosos junto à membrana citoplasmática por metaloredutases codificadas pelos genes *FRE1*, *FRE2* e *FRE3* (Dancis *et al.*, 1990; Georgatsou & Alexandraki, 1994; Yun *et al.* 2001; Philpott *et al.*, 2002). Este sistema é expresso sob condições de carência de ferro e sob controle de Aft1p, o principal fator de transcrição dependente de ferro das leveduras (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1995; Yun *et al.* , 2001; Yamaguchi-Iwai *et al.*, 2002). Num segundo passo, o ferro reduzido é absorvido através de um complexo de transportadores que contém uma multi-cobre oxidase codificada por *FET3* e uma ferro-permease codificada por *FTR1* (Kosman, 2003). Substratos para estes sistemas incluem sais de ferro, quelatos de ferro de baixa afinidade e complexos ferro-sideróforos (Yun *et al.*, 2000 a, b).

Três genes adicionais regulados por Aft1p e que exibem similaridades com a sequência de *FRE2* foram descritos, sendo estes os genes *FRE4*, *FRE5* e *FRE6*, entretanto não foi mostrado que estes genes codificam proteínas com atividade de redutases (Martins *et al.*, 1998; Yun *et al.*, 2001). Ainda, um parálogo de *AFT1* foi descrito em *S. cerevisiae* sendo este designado *AFT2* (Blaiseau *et al.*, 2001). Foi demonstrado, que *AFT2* codifica um fator de transcrição que ativa a expressão gênica em resposta a condições de baixo suprimento de ferro e sugeriu-se que estes fatores de transcrição possuem papéis sobrepostos no controle de vias metabólicas reguladas por ferro (Blaiseau *et al.*, 2001; Rutherford *et al.*, 2001).

Diversos outros genes envolvidos na captação de ferro foram descritos em *S. cerevisiae*. Entre estes, está a família de genes *FIT1-FIT3* que codificam proteínas que são incorporadas à parede celular via ancoradores e estão envolvidas na retenção do complexo ferro-sideróforo à parede celular facilitando a captação do complexo através da membrana plasmática (Philpott *et al.*, 2002). Também, genes envolvidos em sistemas de captação de baixa afinidade por ferro foram descritos. Os genes *SMF1-SMF3* codificam proteínas transportadoras de íons metálicos divalentes que estão envolvidas na captação de ferro(II),

embora não sejam específicas para ferro (Cohen *et al.*, 2000; Kosman, 2003). Ainda, a proteína transmembrana tipo 2 Fet4p codificada pelo gene *FET4* está envolvida na captação de ferro e cobre presentes no meio extracelular na forma divalente (Dix *et al.*, 1997; Kosman, 2003).

Em *P. chrysosporium* e *L. edodes*, foi descrita a expressão de proteínas ferro-reguladas. Verificou-se que vários polipeptídios com massa molecular entre 41 e 45 kDa e pIs variando de 4,3 a 5,0 tiveram sua expressão induzida pela carência de ferro. Os autores sugeriram que como o tamanho e o ponto isoelétrico mostrados pelas proteínas identificadas por SDS-PAGE e gel 2-DE são característicos de lignina e manganês peroxidases, algumas isoformas destas peroxidases poderiam ter sua expressão regulada por ferro (Hernández-Macedo *et al.*, 2002). Até o momento, nenhum estudo dos poucos já realizados permitiu identificar genes envolvidos nas vias de biossíntese e de transporte do ferro para o interior das células e o papel do ferro nas vias metabólicas nestes fungos, especialmente nas espécies *P. chrysosporium* e *L. edodes*.

OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos a identificação e isolamento de genes regulados por ferro que estejam envolvidos tanto na via biossintética e de transporte de sideróforos, como envolvidos em outras rotas metabólicas celulares reguladas por ferro buscando contribuir para o conhecimento destas vias metabólicas nos fungos de degradação branca *Phanerochaete chrysosporium* e *Lentinula edodes*.

Capítulo 1

Estabelecimento das condições de cultivo para o estudo de genes envolvidos na aquisição de ferro em fungos que degradam madeira.

1. Introdução

Uma variedade de técnicas tem sido desenvolvidas para a detecção da produção de sideróforos, sendo que o método mais comum de detecção é o ensaio químico universal, também conhecido como Ensaio Universal com Cromo Azurol S (CAS) desenvolvido por Schwyn & Neilands (1987) com base na alta afinidade destes compostos quelantes por ferro(III) (Milagres *et al.*, 1999; Shin *et al.*, 2001; Calvente *et al.*, 2001; Machuca & Milagres, 2003). Este ensaio é baseado na competição por ferro entre o complexo férrico de um corante indicador, no caso o CAS, com um quelante ou sideróforo. A reação com o corante CAS consiste no deslocamento do ferro(III) contido previamente no complexo ferro(III)-CAS por outro quelante com maior afinidade para o íon metálico, desta forma quando um quelante mais forte remove o ferro(III) do complexo ferro-CAS sua cor passa de azul a laranja ou rosa (Schwyn & Neilands, 1987). Desta forma, pode-se verificar, dependendo da quantidade de quelante produzido pelo fungo, uma mudança de cor do meio de cultivo a qual pode ser medida em espectrofotômetro pela sua absorção no comprimento de onda de 630 nm.

Com base neste método, no presente estudo foram obtidas curvas de produção de sideróforos para os fungos *P. chrysosporium* e *L. edodes* crescidos em meio sem disponibilidade ou com concentração muito baixa de ferro(III), e com suprimento de ferro (FeCl_3 90 μM) no meio. Ainda foram obtidas curvas de crescimento do micélio, medidas com base no peso seco de micélio crescido num período de cerca de 20 dias. As medidas do peso e da produção de sideróforos foram feitas a cada 3 dias, em triplicata. Os resultados obtidos nesta etapa do estudo foram incluídos no artigo **“Proteins Induced by Iron-Starvation in White-Rot Fungi Correlate to the Production of Iron-Chelating Compounds”** submetido para a revista *Journal of General and Applied Microbiology* (Hernández-Macedo *et al.*) e apresentado no final deste Capítulo.

2. Materiais e métodos

A curva de produção de sideróforos e a curva de crescimento do micélio foram feitas para obtenção das melhores condições para a coleta e armazenamento do micélio, buscando uma fase de crescimento em que os genes de captação estivessem sendo expressos (detecção da produção de sideróforos pela reação com CAS) e buscando uma quantidade apropriada de massa de micélio para as extrações de DNA e RNA total.

2.1 Espécies de fungo utilizadas

Nos experimentos realizados, foram utilizados os fungos de degradação branca: *Phanerochaete chrysosporium* linhagem BKM 1767 e *Lentinula edodes* linhagem UEC 2019, cedidas pelo Prof. Dr. André Ferraz, do Laboratório de Química da Lignina do Departamento de Biotecnologia (DEBIQ) da Faculdade de Engenharia Química de Lorena (FAENQUIL), SP.

2.2 Manutenção das culturas

As linhagens de fungos usadas como pré-inóculos eram mantidas em placas de Petri contendo o meio de cultivo composto de extrato de malte 2% (Difco) e de ágar 2%. Após o crescimento em placa durante 7-10 dias a 28°C, as culturas foram estocadas em refrigerador.

Em um estudo conduzido por Milagres *et al.* (1999) verificou-se que o conteúdo de ferro no meio de extrato de malte (Merck) foi menor que 1,8 µM. Este resultado foi obtido através de espectrometria de absorção atômica

2.3 Tratamento da vidraria

Para eliminar traços de ferro(III) da vidraria e padronizar as condições de cultura tendo como única variável a quantidade de íons férricos em solução, todo o material utilizado nas culturas (cultivo com ou sem ferro(III)) foi tratado. A vidraria foi deixada por pelo menos 48 h imersa em uma solução 1,2 M HCl. Após esse período, foi autoclavada com uma solução de EDTA 0,1% e em seguida foi feita uma nova autoclavagem com água deionizada.

2.4 Condições de crescimento

Os micélios das espécies de fungo foram crescidos em duas situações diferenciais: a) com disponibilidade de ferro(III) no meio (90 μM de FeCl_3) para repressão da produção de sideróforos e, b) sem ferro(III) ou com concentração de ferro(III) muito reduzida para indução da produção de sideróforos ou de compostos quelantes de ferro. Esta concentração de ferro(III) foi escolhida com base em resultados obtidos por Fekete *et al.* (1989), no estudo da produção de sideróforos em 10 espécies de fungos que degradam madeira. O meio de cultura foi sempre previamente autoclavado por 15 min a 1 atm. As culturas foram incubadas à temperatura de 28°C.

Duas condições de agitação foram utilizadas: a) sem agitação em câmara de germinação e b) com agitação a 120 rpm em agitador orbital (Digital Refrigerated Incubator Shaker, Model C25-KC, New Brunswick).

2.5 Obtenção da curva de crescimento

Na etapa de obtenção da curva de crescimento foi preparada uma suspensão de pré-inóculo para cada espécie de fungo a ser inoculada. Esta suspensão consistia de 25 mL de meio líquido de extrato de malte 2% e micélio em quantidade equivalente a cerca de um quarto da placa de Petri estoque obtida como descrito no item 2.2, deste capítulo. Agitou-se a suspensão para se obter o máximo de homogeneidade. Em seguida, inoculou-se 1,0 mL desta suspensão em 18 Erlenmeyers (por espécie) contendo 25 mL de meio de extrato de malte 2%. Os micélios foram crescidos a 28°C com ou sem agitação. A coleta das amostras foi feita em triplicata aos 3, 6, 9, 12, 15 e 18 dias de cultivo para o meio com adição de ferro(III). Para o micélio crescido sem adição de ferro(III) as amostras (triplicata) foram colhidas aos 3, 6, 9, 12, 15 e 42 dias de cultivo. Decidiu-se medir o resultado aos 42 dias em cultivo no meio sem ferro(III) devido ao fato de não ter sido detectada indução na produção de sideróforos aos 15 dias. E também, com base no estudo de Fekete *et al.* (1989), que analisaram a produção de sideróforos pelo ensaio universal de CAS para 10 espécies de fungos entre as quais o *P. chrysosporium*. Para a reação com CAS, estes autores utilizaram os caldos de cultivo em meio líquido após 30 dias de crescimento.

Para a análise da curva de crescimento foram feitas medidas do peso seco de cada

triplicata por tempo de cultivo. Cada amostra foi filtrada em papel de filtro com ajuda de bomba de vácuo. Os filtros com os micélios foram colocados por aproximadamente uma hora em estufa de 60°C, e em seguida colocados em estufa de 100°C por mais uma hora, após este período foram passados para dessecador contendo sílica para o resfriamento dos pesa filtros e do material filtrado. Após resfriado, o material foi pesado sendo que o procedimento de secagem a 100°C foi repetido até que o peso obtido apresentasse diferença inferior a 2 mg entre o valor obtido na pesagem anterior da mesma amostra. Cabe salientar, que antes da filtragem dos micélios o papel filtro juntamente com o pesa filtro foram colocados na estufa de 100°C por uma hora, resfriados e pesados.

2.6 Dosagem de sideróforos com CAS (Cromo Azurol S)

Para obtenção da curva de produção de sideróforos procedeu-se a dosagem em cada um dos caldos (triplicata). A dosagem de sideróforos no caldo de cultivo foi determinada por reação com reagente CAS tendo sido misturados, 0,5 mL de caldo de cultivo e 0,5 mL de solução de CAS preparada como descrito por Schwyn & Neilands (1987). Para preparar 100 mL da solução do corante inicialmente diluiu-se 6 ml de uma solução de 2mM de HDTMA em cerca de 20 ml de água deionizada. Em seguida adicionou-se lentamente sob agitação a solução composta de: 1,5 ml da mistura da solução de ferro(III) (1mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 10mM HCl) e 7,5 ml da solução de 2 mM CAS. Por último, prepara-se 40 ml de uma solução composta de 4,307 g de piperazina anidra na qual é adicionado cuidadosamente 6,25 ml de 12N de ácido hidrocloreídrico. Esta solução tamponante ($\text{pH} = \text{pK}_a = 5,6$) é acrescentada ao restante da mistura de CAS. O volume final é obtido acrescentando-se água deionizada.

Após 1-2 h da solução de CAS Ter sido misturada com o caldo de cultivo procedeu-se a leitura da absorbância desta reação em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 630 nm. O valor obtido foi comparado com o valor obtido para referência (meio sem inóculo + solução de CAS) calculando-se: $[(\text{referência-caldo de cultivo})/\text{referência}] \cdot 100$. O aparelho foi zerado com a cubeta vazia como branco. Convencionou-se um limite mínimo de significância de 10% da porcentagem obtida no cálculo acima descrito, sendo que resultados abaixo de 10% foram considerados negativos. Este valor foi determinado baseando-se em Machuca (comunicação pessoal) e Machuca & Milagres (2003).

3. Resultados e discussão

Os resultados obtidos nas curvas de crescimento e de produção de sideróforos para o micélio crescido em meio sem ou com adição de ferro(III) em agitação, estão mostrados na Figura 1 para *P. chrysosporium* e na Figura 2 para *L. edodes*. Os resultados obtidos nas curvas de crescimento, obtidas para *P. chrysosporium* e *L. edodes* crescidos em meio sem suprimento de ferro(III) e sem agitação, estão apresentados na Figura 3. Ainda, na Figura 3, estão as curvas obtidas para os micélios de *P. chrysosporium* e *L. edodes* crescidos (sem ferro) com agitação para a comparação entre estas duas condições de cultivo.

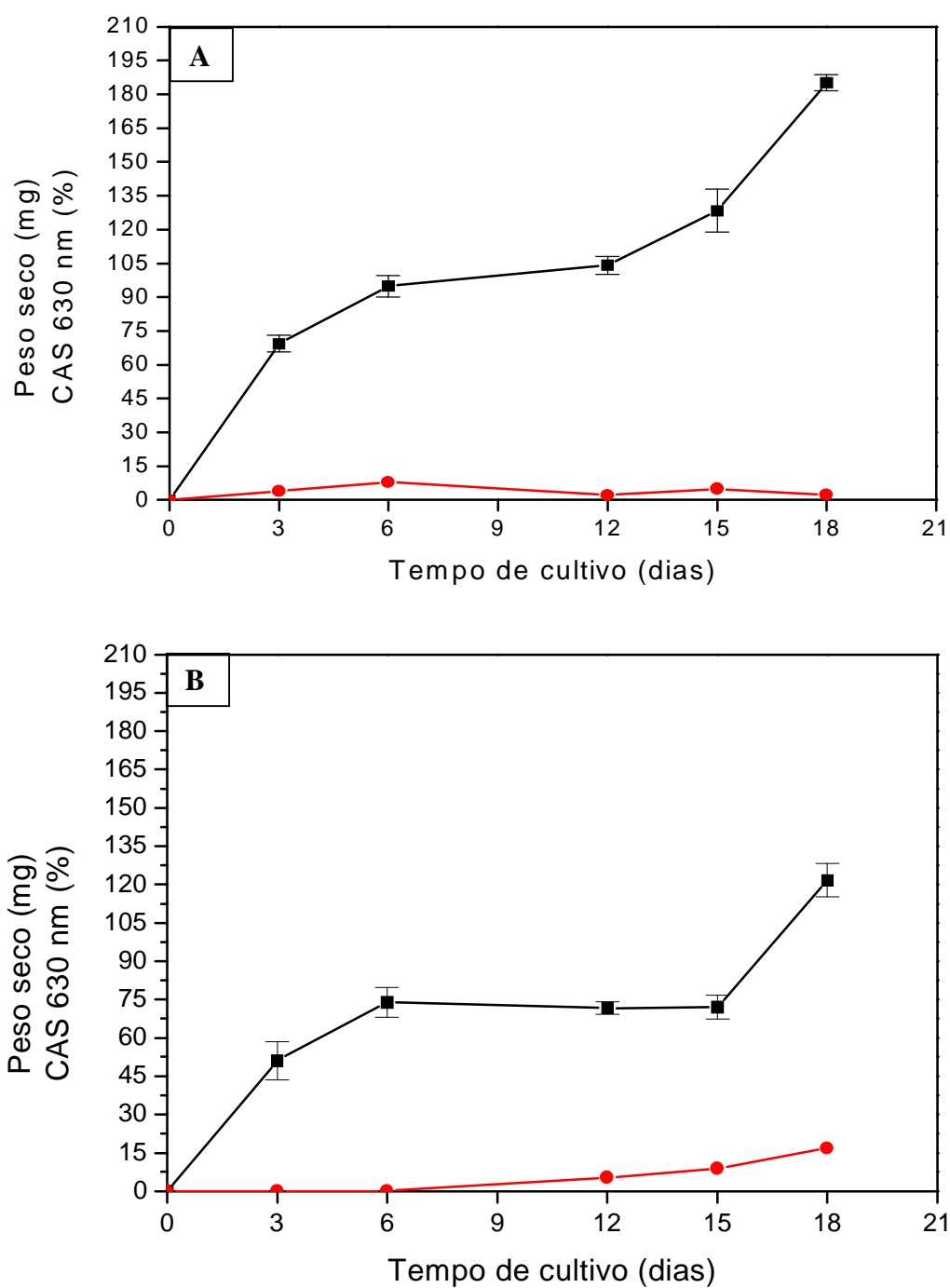


Figura 1. Curva de crescimento medido em peso seco do micélio (■) e de reação com CAS medida em porcentagem de reação do caldo de cultivo com o reagente Cromo Azurol S (●). **A e B.** Curvas obtidas para o fungo *P. chrysosporium* crescido em meio líquido sem adição de ferro e com adição de 90 µM de FeCl₃, respectivamente. Escala do eixo Y: 0 a 210. As barras indicam o desvio padrão de 3 cultivos.

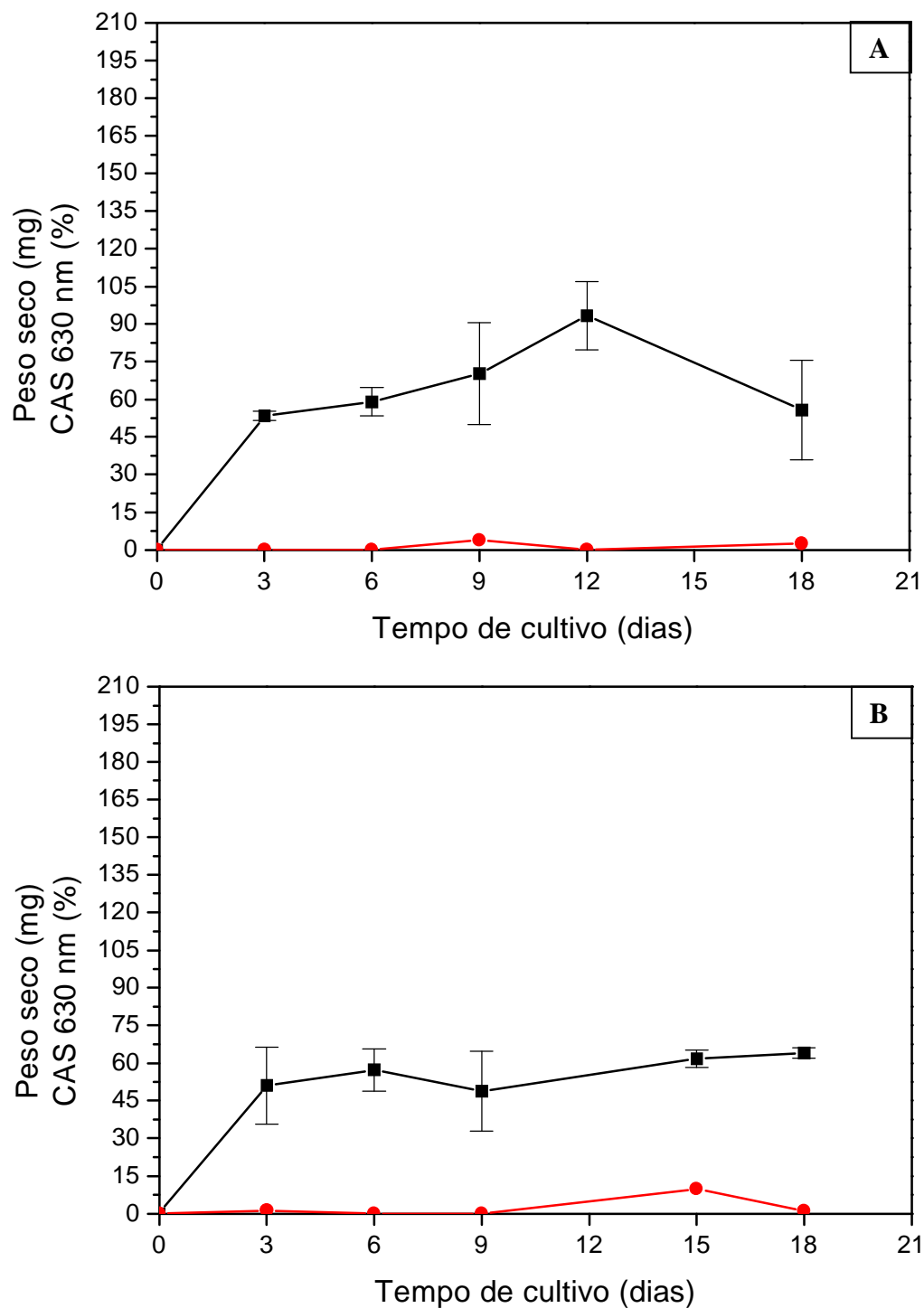


Figura 2. Curva de crescimento medido em peso seco do micélio (■) e de reação com CAS medida em porcentagem de reação do caldo de cultivo com o reagente Cromo Azurol S (●). **A e B.** Curvas obtidas para o fungo *L. edodes* crescido em meio líquido sem adição de ferro e com adição de 90 μM de FeCl_3 , respectivamente. Escala do eixo Y: 0 a 210. As barras indicam o desvio padrão de 3 cultivos.

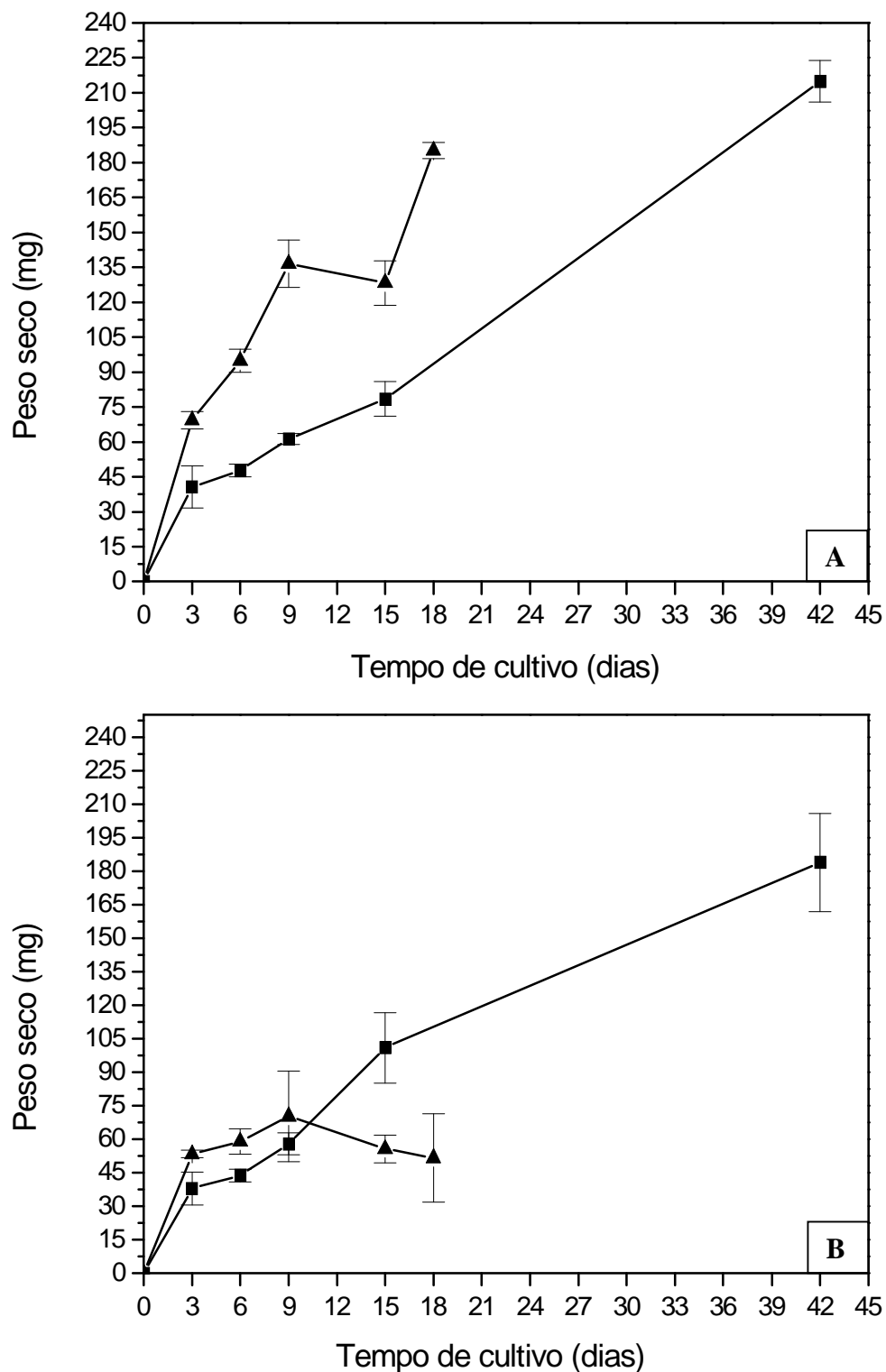


Figura 3. Curvas de crescimento medido em peso seco do micélio crescido sem agitação (■) e com agitação a 120 rpm (▲). **A.** *P. chrysosporium* crescido em meio líquido sem adição de ferro, e **B.** *L. edodes* crescido em meio líquido sem adição de ferro. Escala do eixo Y: 0 a 240 (A) e 0 a 250 (B). As barras indicam o desvio padrão de 3 cultivos.

Verificou-se para *P. chrysosporium* (Figura 1A e 1B), que aos 18 dias de cultivo o micélio apresentava uma tendência ainda ascendente de crescimento independentemente da condição de suprimento de ferro. Ainda, como se pode verificar nas Figuras 1A e 1B, houve um menor crescimento do micélio no meio com suprimento de ferro. Isto deve ter ocorrido devido à toxicidade deste metal a partir de determinadas concentrações para a maioria dos microrganismos (Rutherford *et al.*, 2001; Blaiseau *et al.*, 2001; Braun & Braun, 2002b). O ensaio de CAS para detecção da produção de sideróforos permitiu observar que no meio sem disponibilidade de ferro(III), Figura 1A, não foi obtida uma produção significativa, ou seja acima de 10% de resposta na reação com CAS, o mínimo estabelecido para a resposta ser considerada positiva (item 2.6). Este resultado pode ter sido devido a uma diluição dos compostos no meio líquido dificultando a detecção da reação com o corante. Por outro lado, para o micélio crescido em meio com suprimento de ferro(III), Figura 1B, aos 18 dias de cultivo observou-se uma resposta de 16,8% na reação com CAS, sendo que este resultado não era esperado.

Segundo Shin *et al.* (2001), o uso do método de detecção com CAS em cultivo líquido apresenta alguns problemas inerentes da composição do meio quando se quer medir a produção de sideróforos em meios complexos. A maior dificuldade refere-se ao fato de que vários ingredientes de meios complexos, tal como o extrato de malte, têm coloração amarelada o que interfere seriamente na medição espectrofotométrica da coloração amarela/laranja devida ao CAS livre de ferro. Somando-se a isto, quelantes de baixa afinidade tais como o fosfato, o citrato e o ácido diidroxi-benzóico presentes em meios complexos, podem interferir no resultado do ensaio com CAS em cultivos líquidos. Ainda, acima de pH 7,0 a cor azul da solução de CAS pode mudar para amarelo devido à formação de hidróxido de ferro.

Desta forma o resultado (reação positiva na reação com CAS) obtido para o fungo *P. chrysosporium* crescido em meio com suprimento de ferro pode ter sido devido a um ou mais fatores dos citados acima, os quais podem ter levado a uma medida alterada quanto à presença de corante livre de ferro sendo que o valor obtido (16,8%) se aproxima do valor mínimo estabelecido para que a resposta seja considerada positiva.

Para *L. edodes* (Figura 2A e 2B), cultivado com agitação, aos 18 dias de cultivo observou-se que o micélio cultivado em meio sem ferro (Figura 2A) apresentava uma diminuição no crescimento enquanto que para o micélio crescido em meio com ferro (Figura

2B) observou-se um pequeno crescimento com tendência ao crescimento estacionário. Ainda, como se pode verificar nas Figuras 2A e 2B, houve um menor crescimento do micélio no meio com suprimento de ferro em relação ao micélio crescido sem ferro, como observado para *P. chrysosporium*. Os resultados obtidos na curva de produção de sideróforos detectada por meio da reação com CAS foram menores que 10% sendo que desta forma considerou-se que não foi detectada produção de sideróforos por *L. edodes* independentemente na condição de suprimento de ferro no meio de cultivo. Como discutido acima este resultado pode ser devido a uma diluição dos compostos no meio líquido o que poderia estar dificultando a detecção da reação com o corante.

A comparação da curva de crescimento dos micélios crescidos sem e com agitação (Figura 3A e 3B), permitiu verificar que, de um modo geral, para os dois fungos estudados o crescimento do micélio com agitação foi maior em comparação ao crescimento feito sem agitação. Entretanto, para *L. edodes* verificou-se que a partir dos 9 dias de cultivo houve uma queda brusca do crescimento com agitação (Figura 3B) o qual foi retomado aos 15 dias, sendo observada uma tendência de crescimento ascendente neste período. Ainda, como os dados (massa seca de micélio) da curva de crescimento para o micélio crescido sem agitação foram obtidos aos 18 dias de cultivo e novamente só aos 42 dias de cultivo foi possível observar, para os dois fungos, que até este momento havia crescimento. Entretanto, como não foi obtido mais um ponto num tempo de cultivo próximo não é possível afirmar se este crescimento já estava estacionado ou não.

Em um estudo conduzido em nosso grupo (Hernández-Macedo *et al.*, submetido), os resultados apresentados neste capítulo, obtidos no cultivo de micélio em meio líquido com agitação, foram utilizados com o objetivo de correlacionar a produção de compostos quelantes de ferro (ensaio de CAS) em meio líquido e sólido e a expressão de proteínas reguladas por ferro (análise de extratos protéicos por SDS-PAGE).

No ensaio de CAS em meio líquido, como discutido acima, não foi observada reação positiva com CAS para nenhuma das espécies de fungo estudadas em nenhuma das condições de crescimento exceto para *P. chrysosporium* crescido em meio com suprimento de ferro(III) e a partir do 15-18º dia de cultivo, sendo que este resultado pode ter sido devido a outros fatores e não à produção de sideróforos uma vez que esta produção não era esperada para as condições de suprimento de ferro(III). O ensaio de CAS realizado em meio sólido

confirma a suspeita de que outros fatores tenham interferido no resultado obtido para o ensaio líquido em condição de suprimento de ferro uma vez que não foi observada reação no CAS-ágar nos cultivos realizados com meio em que foi adicionado FeCl_3 (Hernández-Macedo *et al.*, submetido). Como descrito no artigo de Hernández-Macedo *et al.* submetido ao periódico *Journal of General and Applied Microbiology* (final do capítulo) para o ensaio de CAS em meio sólido foram utilizadas placas de Petri contendo em uma metade meio de extrato de malte com o corante CAS complexado com ferro(III) e na outra metade meio de extrato de malte com ou sem suprimento de ferro, sem CAS. Isto foi feito devido ao fato da solução do corante possuir o detergente HDTMA (*hexadecyltrimethyl-ammonium bromide*), o qual é tóxico para muitos organismos impedindo o crescimento normal do micélio. Desta forma, micélio de cada um dos fungos estudados foi inoculado na porção das placas que continha somente o meio de cultivo. A reação com CAS foi monitorada até os 11 dias de cultivo, tendo-se observado que para os fungos cultivados em meio sem suprimento de ferro houve uma mudança de cor na porção da placa contendo CAS-ágar a qual iniciou no quarto dia de cultivo, para as duas espécies de fungos. No meio contendo ferro, não foi observada mudança de cor na porção CAS-ágar para nenhum dos fungos estudados. Ainda neste estudo, aos 11 dias de cultivo, o micélio crescido na porção do meio sem CAS foi coletado e usado para a obtenção dos extratos protéicos celulares, os quais foram analisados em gel. Por este experimento, diferentes padrões de proteínas foram observados para os micélios crescidos em meio sem ou com suprimento de ferro(III), indicando que a síntese de proteínas reguladas por ferro pode estar correlacionada com a produção de compostos quelantes de ferro do tipo sideróforos.

Ainda comparando-se o padrão de proteínas obtido por SDS-PAGE para os micélios de *P. chrysosporium* e *L. edodes* crescidos em meio líquido (Hernández-Macedo *et al.*, 2002) com o padrão de proteínas obtido para os micélios dos mesmos fungos crescidos em meio sólido (Hernández-Macedo *et al.*, submetido) verificou-se que os perfis de proteínas reguladas pela condição de suprimento de ferro eram bastante similares. Desta forma, este resultado permite concluir que embora não tenha sido detectada a reação positiva de CAS no presente estudo, provavelmente devido a uma diluição ocasionada no meio líquido, a expressão dos genes regulada por ferro no micélio crescido em meio líquido é muito semelhante àquela observada para o micélio crescido em meio sólido para o qual se detectou reação com o corante CAS, principalmente no caso de *P. chrysosporium*.

4. Conclusões

De um modo geral observou-se um crescimento de massa micelial ascendente entre 9 e 12 dias de cultivo sendo que o período determinado para a coleta do micélio foi estabelecido para 10 dias em cultivo com agitação (110 rpm), período no qual os genes que codificam proteínas envolvidas na aquisição do ferro entre elas as envolvidas na síntese de compostos quelantes de ferro, entre estes sideróforos, deveriam estar sendo expressos.

Considerou-se que não houve detecção da produção de sideróforos pelo ensaio de CAS em meio líquido nas condições de crescimento utilizadas neste estudo. Entretanto, este resultado pode ter sido devido a uma diluição no meio líquido dos compostos secretados pelo micélio durante o desenvolvimento o que estaria dificultando a detecção da reação com o corante.

Artigo 1.

PROTEINS INDUCED BY IRON-STARVATION IN WHITE-ROT FUNGI CORRELATE TO THE PRODUCTION OF IRON-CHELATING COMPOUNDS

Maria Lucila Hernández-Macedo¹, Eliana Maria Assmann¹, André Ferraz², Jaime Rodríguez³, Laura Maria Mariscal Ottoboni¹, Maricilda Palandi De Mello¹ (✉)

¹*Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Caixa Postal 6010, 13083-970 Campinas, SP, Brasil*

²*Departamento de Biotecnologia (DEBIQ), Faculdade de Engenharia Química de Lorena (FAENQUIL), Caixa Postal 116, 12600-000 Lorena, SP, Brasil*

³*Laboratorio de Recursos Renovables, Universidad de Concepción, Casilla 160-C, Concepción, Chile.*

Running head: Iron-chelating compounds and induced proteins

Corresponding author:

Maricilda Palandi de Mello, Ph.D., CBMEG-UNICAMP, Caixa Postal 6010

13083-970, Campinas, SP, Brasil. Phone # (55-19) 3788-1146. Fax # (55-19) 3788-1089.

e-mail: mmello@unicamp.br

Abbreviations: PAGE - polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-sodium dodecyl sulfate; PMSF-phenylmethanesulfonyl fluoride; kDa-kilodalton (molecular mass).

Summary

Lignin biodegradation by white-rot fungi is an enzymatic process caused by oxidative enzymes. In addition, low molecular mass iron-complexing compounds produced by fungi under nutritional iron-starvation might mediate wood biodegradation. The purpose of this paper was to correlate the expression of iron-regulated proteins to the production of iron-chelating compounds using differential SDS-PAGE profiles and a modification of the universal chrome-azurol S (CAS)-agar plate assay. Two wood-degrading fungi were studied, *Phanerochaete chrysosporium* and *Lentinula edodes*. Both showed color change on the CAS-blue agar under iron-starvation, starting on the fourth day of culture. When 90 μM FeCl_3 was present in the medium, CAS color change was not observed during the 11 days of culture when mycelia reached an early-stationary phase of growth. For each condition, mycelial protein extracts were analyzed by SDS-PAGE and different protein profiles were observed for mycelia cultured under iron-starvation and iron-replete agar-media indicating that the synthesis of some iron-regulated proteins may correlate with the production of siderophore-like iron-chelators.

Key words: iron-chelating compounds; white-rot fungi; white-rot iron responsive proteins.

Introduction

White-rot is a type of wood decay caused by fungi belonging to Basidiomycotina. These fungi present a great capacity to degrade all the components of the wood, particularly lignin (Ander and Eriksson, 1977; Leonowicz *et al.*, 1999). A great diversity exists among several fungal species that cause white-rot, and different mechanisms of lignin degradation may occur (Blanchette, 1995). White-rot can be divided into two additional sub-types. One involves the decay of all wood components simultaneously. Wood decay occurs by formation of erosion troughs and by progressive thinning of wood cell walls. This type of decay is consistent with a model in which several polymer-degrading enzymes act on the exposed surfaces of the wood cell walls producing a progressive removal of wood components from the lumen to the middle lamella. The second type of white-rot is produced by a relatively small number of white-rot fungi that are selective for lignin degradation. In this case, removal of lignin and polyoses from the wood cell walls occurs without progressive thinning of the wall. For this kind of white-rot, it has been demonstrated that the direct action of the enzymes on wood cell walls cannot explain the biodegradation process. Extracellular enzymes produced by wood-degrading fungi are too large to penetrate the intact wood cell wall (Abuja *et al.*, 1988; Carpita *et al.* 1979). Therefore low molecular mass compounds (LMMC) might precede enzymes into the microvoids of lignocellulose structure (Paice *et al.*, 1993; Tanaka *et al.*, 1991; 1996). In addition, the participation of LMMC in wood decay has been well documented. Among the LMMCs, those with metal chelating characteristics, especially iron-chelating compounds are distinguished (Goodell, *et al.*, 1997; Machuca *et al.*, 1999). Jellison *et al.* (1991) reported the production of low molecular mass iron-binding compounds by *Gloeophyllum trabeum*, a brown-rot fungus. Today it is well known that brown-rot fungi use Fenton type mechanisms involving the participation of iron chelators in wood biodegradation (Goodell *et al.*, 1997; Jensen *et al.*, 2001; Kerem *et al.*, 1999; Paszczynski *et al.*, 1999), but a similar process in white-rot fungi is not clear. The production of iron chelating compounds by some white-rot species and the capacity of those chelants to oxidize phenolic compounds such as lignin and chlorolignin have been described by several groups (Ferraz *et al.*, 2001; Parra *et al.*, 1998 a, b; Tanaka *et al.*, 1999).

Iron, as an essential element for fungal metabolism and growth as well as an active component of the extracellular heme enzymes that are involved in white-rot degradation, may play a role in the wood biological degradation (Jellison *et al.*, 1991, Rodríguez *et al.*, *in press*). It is the fourth most abundant metal in the earth's crust, but despite this abundance, the acquisition of this essential nutrient represents a challenge for most organisms because its extremely low solubility and bioavailability under aerobic conditions at physiological pH (Bagg and Neilands, 1987). In response to Fe-stress, many microorganisms excrete high iron-affinity LMMC into the extracellular medium, termed siderophores, to scavenge and solubilize ferric iron (Hider, 1984; Neilands, 1984, 1995). The well-known and widely used method for detection of siderophores in solid medium is the universal agar plate assay described by Schwyn and Neilands (1987). The assay is based on a competition for iron between CAS dye and a chelator produced by microorganisms. A modification of this assay developed to avoid problems with toxicity of the reagents for basidiomycetes and Gram-positive bacteria was recently reported (Milagres *et al.*, 1999). Fekete *et al.* (1989) described the first study on siderophore production by wood-decay fungi. They assayed several basidiomycetes for iron-chelant production, including a *Phanerochaete chrysosporium* strain. All species tested positive after 3 weeks of incubation under iron starvation, whereas the presence of iron in the culture medium repressed siderophore production. By modifying the CAS-agar assay, Milagres *et al.* (1999) also confirmed the production of iron-chelating compounds by basidiomycetes including white-rot *P. chrysosporium* and *Lentinula edodes*.

In this study, both production and repression of iron-chelating compounds in *P. chrysosporium* and *L. edodes* cultured on solid malt extract medium have been investigated using modified CAS-agar assay. Mycelia growth was monitored during 11 days in cultures under iron-restriction and iron-supplied conditions. Protein extracts from the tested samples were compared by SDS-PAGE to detect differential band patterns between the two experimental conditions.

Material and Methods

Microorganisms and CAS assay

Two wood-decay fungal species were used in this study, *P. chrysosporium* BKM-1767 and *L. edodes* UEC-2019, which was kindly provided by Prof. Nelson Durán from the Biological Chemistry Laboratory, UNICAMP, Brasil and maintained in the culture collection of the Department of Biotechnology, Lorena, SP, Brasil. Fungal stock cultures were maintained on 2% malt-extract-agar (MEA) plates, grown at 28°C and stored at 5°C. Fe-replete condition were established by adding 90 µM FeCl₃ to the culture medium. For Fe-starvation, iron traces were removed by treating all glass flasks with 10% HCl for 48 hours, autoclaved at 1 atm for 15 minutes with 10 mM EDTA, and rinsed with deionized sterile water. Growth curves for each fungal mycelium incubated in liquid medium under differential iron conditions were obtained as follows. To proceed with the inoculation of the cultures a mycelial suspension was prepared from a pre-culture in 25 mL of 2% malt-extract liquid medium. The suspension was shaken to obtain maximum homogeneity. Thereafter, 1 mL of this suspension was inoculated in 125 mL Erlenmeyers containing 25 mL of medium. A total of 15 Erlenmeyers for species were prepared. To construct the growth curves, mycelia were collected by filtration and dry at 60°C for 1 h followed by 1h at 100°C. After that they were let to cool to room temperature in a vacuum desiccator and weighted. For each sample, the whole drying procedure was repeated. Dry weight was obtained when the weight variation was below 2 mg after several drying steps. Samples were recovered every 3 days (each point corresponding to the mean of 3 independent measures).

The modified universal CAS assay described by Milagres *et al.* (1999) was used to test both the induction and the repression of iron-binding compounds in response to Fe-starvation and Fe-replete conditions, respectively. CAS-blue agar was prepared according to Schwyn and Neiland (1987). To establish differential Fe-growth media, MEA plates with or without 90 µM FeCl₃ were prepared. An experimental plate was divided in halves containing in one side MEA medium with or without iron and in the other side the CAS-blue agar. For each condition, *P. chrysosporium* and *L. edodes* taken from freshly prepared culture plates were inoculated in the

halves containing culture media. The plates were incubated at 28°C. The CAS reaction was monitored daily during 11 days by observing the advance of the color-change front in the CAS-blue agar, starting from the borderline between the two media. Mycelia were recovered by scraping the plates. They were frozen in liquid nitrogen and stored at –80°C until use.

Cellular protein extraction and SDS-PAGE analyses

Cellular protein extracts were obtained from *P. chrysosporium* and *L. edodes* mycelia grown in the presence of 90 µM iron and in the absence of the metal. Mycelia recovered from each growth condition were grounded to a fine powder in liquid nitrogen with a pestle and a mortar. The protein extraction procedure was according to De Mot and Vanderleyden (1989). Originally, the method was described for *Azospirillum* species; recently, it had been used for *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Novo *et al.*, 2000), for plant tissues (Mangolin *et al.*, 1999), and was adapted for fungal mycelia (Hernández-Macedo *et al.*, 2002). After isolation, cellular proteins were suspended in lysis buffer (9.8 M urea, 2% (v/v) Nonidet P-40, 100 mM dithiothreitol). Protein samples were stored at –70 °C until loaded in a gel. In all cases protein concentration was determined according Bradford (1976). Approximately 40 µg of cellular proteins were loaded in 15% SDS-PAGE according to Laemmli (1970). The 10 kDa Protein Ladder (Gibco-BRL, Bethesda, USA) was used as molecular weight standard to estimate differentially expressed mycelial protein molecular weights. The protein profiles were visualized by silver staining as described by Blum *et al.* (1987).

Results

Mycelia growing curves

To test if the different culture conditions cause significant changes in the mycelia growth curves, dry weight of each fungal species from liquid culture was followed. Although the rate of growth is similar in iron-sufficient and iron-deficient conditions an inhibition effect was observed by the presence of iron, especially for *P. chrysosporium* (Fig.1). In contrast, on agar plates, the two different culture conditions did not seem to interfere significantly with fungal growth as the time to cover the MEA half of the plate was the same for each fungus under both conditions.

CAS-agar Universal test plate

After four days of incubation, mycelia of both species presented a complete covering in the MEA-half culture plates. Positive reaction in the modified CAS universal plate assay resulted in a color change of the blue CAS-agar reagent placed in half-plate to pink or light pink depending on the fungal species. Figure 2 shows culture plates from the fourth to the eleventh day of mycelial incubation. Under iron-stress, the blue color on the CAS-agar medium was replaced by a pink color or a light pink color observed for *P. chrysosporium* and *L. edodes*, respectively (lanes A, C). In contrast, mycelia incubated in iron-replete plates did not promote CAS color change during the same period of culture (lanes B, D).

Total proteins extraction and SDS-PAGE analyses

Eleven-day-old MEA cultured mycelia of the two species were collected from the iron-supply and the iron-restriction plates. Analysis of cellular protein extracts in SDS-PAGE gels showed differential patterns for each culture condition. On repeated protein preparations and different SDS-PAGE runs, the apparent MW for the proteins that had an increased synthesis in *P. chrysosporium* iron-deficient mycelia corresponded to: $M_r = 21, 27, 37, 48$ and 61 (Fig. 3, A). For *L. edodes* iron-deficient mycelia, the apparent MW for the proteins that have an increased expression were: $M_r = 11, 18, 20, 24, 28, 30, 31, 37, 48$ and 57 (Fig. 3, B).

Discussion

In this paper we describe the expression of iron-chelating compounds by *P. chrysosporium* and *L. edodes* throughout 11 days of growing in malt-extract-agar plates. Those compounds were efficiently repressed by iron suggesting a siderophore origin. We also verified the production of iron-regulated proteins in agar-plate growing mycelia under the two conditions. In a previous paper we described the identification of iron-regulated proteins expressed in the two species cultured only in liquid malt extract medium (Hernández-Macedo *et al.*, 2002). However, siderophore detection in liquid medium was inefficient for mycelia using CAS reaction after 11 days of culture (data not shown). CAS-positive reactions for wood decay fungi have been described in filtrates from 3-4 weeks old cultures, that is, late-stationary phase mycelium cultures (Fekete *et al.*, 1989; Jellison *et al.* 1991). In the present study, a modified CAS-agar plate assay showed positive reaction starting from the fourth day of culture under iron-starvation conditions (Fig. 2). Iron-starving cultures began to change the CAS-blue color to pink in *P. chrysosporium* plates (Fig. 2A), in the 11th day the blue half of the plate had become completely changed. In *L. edodes* plates the color change also began on day four (Fig. 2C), even though CAS-blue color turned light pink. The color change in both fungi was repressed by the presence of 90 μM FeCl_3 in MEA cultures (Fig. 2B, D). It can be inferred from those data that malt extract has low iron availability whereas it is a complete medium for fungal growth (Fig. 1). Therefore, the production of high affinity iron chelating compounds is induced in this medium (Fig. 2). Some other papers also describe the production of iron-chelating compounds by wood-decay fungi under several situations (Durán and Machuca, 1995; Enoki *et al.*, 1997; Ferraz *et al.*, 2001; Goodell *et al.*, 1997; Milagres *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 1997) even though they did not test the iron-regulated character of their expression.

As discussed by Fekete *et al.* (1989), iron stress in wood-decay fungi may decrease the pH of culture medium (Emery, 1980) and might as well excrete metabolic chelators such as citric acid, not directly involved in iron uptake but can cause color change in CAS reaction. However, Schwyn and Neilands (1987) observed that citrate have to be present in high concentrations to give CAS positive test. In our experiments with liquid medium, the pH measured every three days was around 5.00 for both fungi throughout the 11 days of culture

(data not shown), therefore it was inferred that the color change observed in plates of iron-stressed mycelia is due to chelators involved in the iron uptake process rather than to the production of other acidic chelators.

The results on SDS-PAGE of iron-regulated proteins obtained from mycelia cultured in liquid medium for the two fungal species have been discussed in a previous paper (Hernández-Macedo *et al.*, 2002). By comparing the cellular protein patterns described here with those previously reported, it is observed that iron-responsive protein profiles are very similar for mycelia grown on either liquid or solid media, although we failed to detect iron-chelating compounds in cultures performed in liquid medium. In the present paper we show a correlation between the expression of iron-starvation induced proteins in mycelia harvested from solid culture medium and the formation of iron-chelating compounds.

In the literature, there are very few data about fungal genes and proteins involved in the biosynthesis of siderophore-like compounds (An *et al.*, 1997; Haas *et al.*, 1997, 1999; Mei *et al.*, 1993; Oberegger *et al.*, 2001; Voisard *et al.*, 1993; Yuan *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 1998). For iron-starving mycelia, one polypeptide of 60 kDa for *P. chrysosporium* and one of 57 kDa for *L. edodes* are differently expressed (Fig. 3). Those polypeptides could be the homologs in white-rot fungi of proteins involved in siderophore biosynthesis such as the L-Ornithine N5-oxygenase in *Ustilago maydis*, which is a polypeptide with an estimated M_r of 62 kDa (Mei *et al.*, 1993). Additionally, for both *P. chrysosporium* and *L. edodes* it is observed a 37 kDa polypeptide with increased expression under iron-starvation. This polypeptide might represent lignin (LiP) or manganese peroxidases (MnP), since the great majority of such enzymes have M_r ranging from 35 to 40 kDa. It is well known that several LiPs are differently regulated under limitation for either carbon or nitrogen nutrients (Leisola, 1987; Stewart & Cullen, 1999). Therefore, iron limitation could be also a regulating condition for LiP expression. Actually, an ongoing parallel research project identified a GLG5 LiP-homolog transcript only in mycelia grown under iron-starvation condition (Assmann EM, personal communication).

Other polypeptides induced by iron-starvation observed in *P. chrysosporium* and *L. edodes* SDS-PAGE profiles can be involved in the transport of iron-complexes through the cellular membrane. In *Saccharomyces cerevisiae* there is a siderophore-mediated iron transport pathway, which depends on various homologous transporters belonging to the major super-facilitator family (MSF) (Lesuisse *et al.*, 1998, 2001; Yun *et al.*, 2000a, 2001).

Recently, Blaiseau *et al.* (2001) presented data suggesting that two iron-regulated proteins, Aft1p (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1995, 1996; Yun, *et al.*, 2000b) and Aft2p with estimated M_r 76 kDa and 46 kDa, respectively, have overlapping functions in the modulation of the expression of MSF proteins.

This paper describes for the first time the expression iron-starvation induced proteins concomitantly with the production of iron-chelating compounds in two white-rot fungi in the early-stationary growing phase. Therefore, the proteins described here might be involved in the iron-uptake and transport processes. Further investigation is necessary to verify which, among iron-regulated proteins described here, are involved in iron-chelator biosynthesis pathway or in the iron-complex transport process.

Acknowledgments

The authors would like to thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil for financial support (grants n°: 98/00548-4 to MPdM, 98/04519-9 to MLHM, and 97/14314-2 to EMA). The authors also thank Prof. Dr. Adriane Milagres for the assistance with CAS-assays and all technical members of Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, SP, Brasil. A special mention to Maria Madalena V. Rosa (Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil) for technical support. The authors declare that the experiments comply with the current laws of Brasil where they were performed.

References

- Abuja, P. M., Schumuck, M., Pilz, I., Tomme, P., Claeysens, M., and Esterbauer, H. (1988) Structural and functional domains of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *Enc. Biophys. J.*, **15**, 339-342.
- An, Z., Mei, B., Yuan, W., M., and Leong, S., A. (1997) The distal GATA sequences of the *sid1* promoter of *Ustilago maydis* mediate iron repression of siderophore production and interact directly with Urbs1, a GATA family transcription factor. *EMBO J.*, **16**, 1742-1750.
- Ander, P., and Eriksson, K., E. (1977) Selective degradation of wood components by white-rot fungi. *Physiol. Plant.*, **41**, 239-248.
- Bagg, A., and Neilands, J., B. (1987) Molecular mechanism of regulation of siderophore-mediated iron assimilation. *Microbiol. Rev.*, **51**, 509-518.
- Blaiseau, P., L., Lesuisse, E., and Camadro, J., M. (2001) Aft2p, a novel iron-regulated transcription activator that modulates, with Aft1p, intracellular iron use and resistance to oxidative stress in yeast. *J. Biol. Chem.*, **276**, 34221-34226.
- Blanchette, R., A. (1995) Degradation of the lignocellulose complex in wood. *Can. J. Bot.*, **73** (Suppl.1), S999-S1010.
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein dye utilizing. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Blum, H., Beier, and Gross, H., J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, **8**, 93-99.
- Carpita, N., Sabulose, D., Montezinos, D., and Delmer, D., P. (1979) Determination of the pore size of cell walls of living plant cells. *Science*, **205**, 1144-1147.
- De Mot, R. and Vanderleyden, J. (1989) Application of two-dimensional protein analysis for strain fingerprinting and mutant analysis of *Azospirillum* species. *Can. J. Microbiol.*, **35**, 960-967.
- Durán, N. and Machuca, A. (1995) Kraft pulp bleaching by an extracellular low molecular weight metabolite from the ascomycete *Thermoascus aurantiacus*. *Holz Roh Werkstoff*, **53**, 346.

- Enoki, A., Itakura, S., and Tanaka, H. (1997) The involvement of extracellular substances for reducing molecular oxygen to hydroxyl radical and ferric iron to ferrous iron in wood degradation by wood decay fungi. *J. Biotechnol.*, **53**, 265-272.
- Emery, T. (1980) Iron deprivation as a biological defence mechanism. *Nature*, **287**, 776-777.
- Fekete, F., A, Chandhoke, V., and Jellison, J. (1989) Iron-binding compounds produced by wood-decaying basidiomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 2720-2722.
- Ferraz, A., Parra, C., Freer, J., Baeza, J., and Rodriguez, J. 2001. Occurrence of iron-reducing compounds in biodelignified palo podrido wood samples. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **47**, 203-208.
- Goodell, B., Jellison, J., Lui, J., Daniel, G., Paszcynski, A., Fekete, F., Krishnamurthy, S., Jun, L., and Xu, G. (1997) Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolated from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood. *J. Biotechnol.*, **53**, 133-162.
- Haas, H., Angermayr, K., and Stoffler, G. (1997) Molecular analysis of a *Penicillium chrysogenum* GATA factor encoding gene (sreP) exhibiting significant homology to the *Ustilago maydis* urbs1 gene. *Gene*, **184**, 33-37.
- Haas, H., Zadra, I., Stoffler, G., and Angerma, Y.R. K. (1999) The *Aspergillus nidulans* GATA factor SREA is involved in regulation of siderophore biosynthesis and control of iron uptake. *J. Biol. Chem.*, **274**, 4613-4619.
- Hernández-Macedo, M. L., Ferraz, A., Rodríguez, J., Ottoboni, L. M. M., and De Mello, M.,P. (2002) Iron-regulated proteins in *Phanerochaete chrysosporium* and *Lentinula edodes*: differential analysis by sds-page and two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis profiles. *Electrophoresis*, **23**, 655-661.
- Hider, R. C. (1984) Siderophore mediated absorption of iron. *Struct. Bond.*, **58**, 25-87.
- Jellison, J., Chandhoke, V., Goodell, B., and Fekete, F. A. (1991) The isolation and immunolocalization of iron-binding compounds produced by *Gloeophyllum trabeum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **35**, 805- 809.
- Jensen, K. A. JR., Houtman, C. J., Ryan, Z. C., and Hammel, K. E. (2001) Pathways for extracellular Fenton chemistry in the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 2705-2711.

- Kerem, Z., Jensen, K. A., and Hammel, K. E. (1999) Biodegradative mechanism of the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*: evidence for an extracellular hydroquinone driven fenton reaction. *FEBS Lett.*, **446**, 49–54.
- Laemmli, V. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 37.
- Leisola, M. S., Kozulic, B., Meussdoerffer, F., and Fiechte, A. (1987) Homology among multiple extracellular peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.*, **262**, 419-424.
- Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterec, J., Ziegenhagen, D., Wasilewska-Wojtas, M., Cho, N. S., Hofrichter, M., and Rogalski, J. (1999) Biodegradation of lignin white rot fungi. *Fungal Gen. Biol.*, **27**, 175-185.
- Lesuisse, E., Simon-Casteras, M., and Labbe, P. (1998) Siderophore-mediated iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: the SIT1 gene encodes a ferrioxamine B permease that belongs to the major facilitator superfamily. *Microbiology*, **144**, 3455-3462.
- Lesuisse, E., Blaiseau, P. L., Dancis, A., and Camadro, J. M. (2001) Siderophore uptake and use by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, **147**, 289-298.
- Machuca, A., Aoyama, H., and Duran, N. (1999) Isolation and partial characterization of an extracellular low-molecular mass component with high phenoloxidase activity from *Thermoascus aurantiacus*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **256**, 20-26.
- Mangolin, A. C., Ottoboni, L. M. M., and Machado, M. F. P. S. (1999) Two-dimensional electrophoresis of *Cereus peruvianus* (Cactaceae) callus tissue proteins. *Electrophoresis*, **20**, 626-629.
- Mei, B., Budde, A. D., and Leong, S. A. (1993) Sid1, a gene initiating siderophore biosynthesis in *Ustilago maydis*: molecular characterization, regulation by iron, and role in phytopathogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **90**, 903-907.
- Milagres, A. M. F., Machuca, A., and Napoleao, D. (1999) Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. *J. Microbiol. Meth.*, **37**, 1-6.
- Neilands, J. B. (1984) Methodology of siderophore. *Struct. Bond.*, **58**, 1-24.
- Neilands, J. B. (1995) Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.*, **270**, 26723-26726.

- Novo, M. T., Da Silva, A. C., Moreto, R., Cabral, P. C., Costacurta, A., Garcia, O. Jr., and Ottoboni, L. M. M. (2000) *Thiobacillus ferrooxidans* response to copper and other heavy metals: growth, protein synthesis and protein phosphorylation. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **77**, 187-195.
- Oberegger, H., Schoeser, M., Zadra, I., Abt, B., and Haas, H. (2001) SREA is involved in regulation of siderophore biosynthesis, utilization and uptake in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.*, **41**, 1077-1089.
- Paice, M. G., Reid, I. D., Bourbonnais, R., Archibald, F. S., and Jurasek, L. (1993). Manganese peroxidase, produced by *Trametes versicolor* during pulp bleaching, demethylates and delignifies kraft pulp. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 260-265.
- Parra, C., Rodriguez, J., Baeza, J., Freer, J., and Duran, N. (1998a) Iron-binding catechols oxidating lignin and chlorolignin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **25**, 399-402.
- Parra, C., Santiago, M. F., Rodriguez, J., and Duran, N. (1998b) Hydroxamate iron complex with phenoloxidase activity acting on lignin and chlorolignins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **249**, 719-722.
- Paszczynski, A., Crawford, R., Funk, D., and Goodell, B. (1999) De novo synthesis of brown rot 4,5-dimethoxycatechol and 2, 5-dimethoxyhydroquinone by the fungus *Gloeophyllum trabeum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 674-679.
- Rodríguez, J., Ferraz, A., De Mello M.P. in press Role of Metals in Wood Biodegradation. ACS Symposium Series # 845. In *Wood Deterioration and Preservation: Advances in Our Changing World*. Goodell, J.B., Nicholas D. D., Schultz, T., (eds.). Oxford University Press Book News Inc.®, Portland, OR.
- Rodríguez, J., Oses, R., Parra, C., Freer, J., and Baeza, J. (1997) Siderophore Production by Lignin Degrading Fungi. *Proceedings of the Symposium of Chemistry of Lignins and Other Wood Components (Curitiba, Brazil)*, **5**, 601-604.
- Schwyn, B. and Neilands, J. B. (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.*, **160**, 46-56.
- Stewart, P., and Cullen, D. (1999) Organization and differential regulation of a cluster of lignin peroxidase genes of *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.*, **181**, 3427-32.

- Tanaka, H., Fuse, G., and Enoki, A. (1991) An extracellular H₂O₂-producing and H₂O₂-reducing glycopeptide preparation from the lignin-degrading white-rot fungus, *Irpex lacteus*. *Mokuzai Gakkaishi*, **37**, 986–988.
- Tanaka, H., Itakura, S., Hirano, T., and Enoki, A. (1996) An extracellular substance from the white-rot basidiomycetes *Phanerochaete chrysosporium* for reducing molecular oxygen and ferric iron. *Holzforschung*, **50**, 541–548.
- Tanaka, H., Itakura, S., and Enoki, A. (1999) Hydroxyl radical generation by an extracellular low-molecular-weight substance and phenol oxidase activity during wood degradation by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*. *J. Biotech.*, **75**, 57–70.
- Voisard, C., Wang, J., Mcevoy, J. L., Xu, P., and Leong, S. A. (1993) Urbs1, a gene regulating siderophore biosynthesis in *Ustilago maydis*, encodes a protein similar to the erythroid transcription factor GATA-1. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 7091–7100.
- Yamaguchi-Iwai, Y., Dancis, A., Klausner, R. D. (1995) AFT1: a mediator of iron regulated transcriptional control in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, **14**, 1231–1239.
- Yamaguchi-Iwai, Y., Stearman, R., Dancis, A., and Klausner, R. D. (1996) Iron-regulated DNA binding by the AFT1 protein controls the iron regulon in yeast. *EMBO J.*, **15**, 3377–3384.
- Yuan, W. M., Gentil, G. D., Budde, A. D., and Leong, S. A. (2001) Characterization of the *Ustilago maydis* sid2 gene, encoding a multidomain peptide synthetase in the ferrichrome biosynthetic gene cluster. *J. Bacteriol.*, **183** 4040–4051.
- Yun, C. W., Bauler, M., Moore, R. E., Klebba, P. E., and Philpott, C. C. (2001) The role of the FRE family of plasma membrane reductases in the uptake of siderophore-iron in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **276**, 10218–10223.
- Yun, C. W., Ferea, T., Rashford, J., Ardon, O., Brown, P. O., Botstein, D., Kaplan, J., and Philpott, C. C. (2000b) Desferrioxamine-mediated iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence for two pathways of iron uptake. *J. Biol. Chem.*, **275**, 10709–10715.
- Yun, C. W., Tiedeman, J. S., Moore, R. E., and Philpott, C. C. (2000a) Siderophore-iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of ferrichrome and fusarinine transporters. *J. Biol. Chem.*, **275**, 16354–16359.

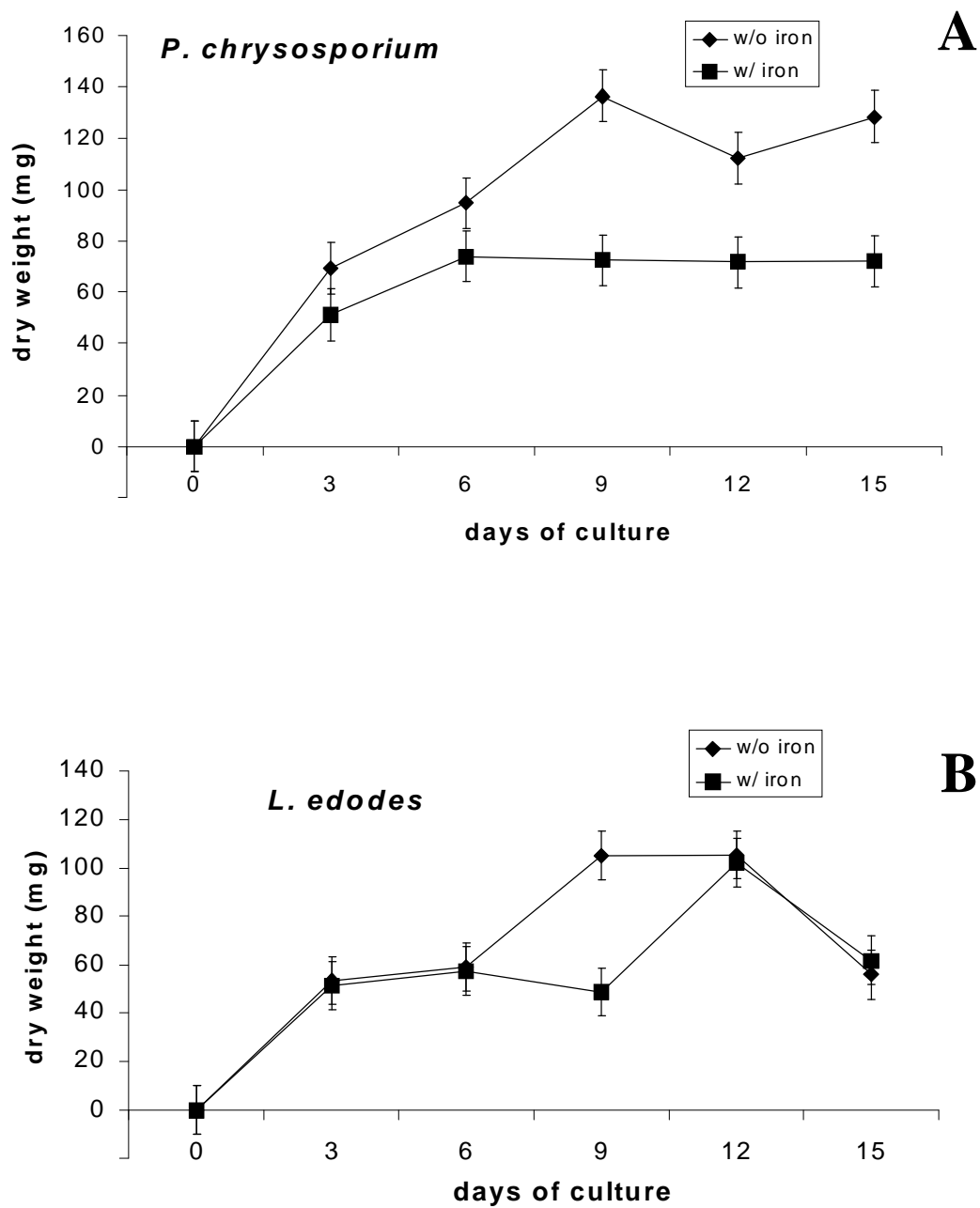


Figure 1, artigo. Growth curves obtained with mycelium dry weights. In the two graphics the curves correspond to mycelia grown in 2% malt extract liquid medium, with or without the addition of 90 μM FeCl_3 , as indicated. (A) Curves for *P. chrysosporium* and (B) curves for *L. edodes*. Each point corresponds to the mean value of three independent measures. W=with and w/o=without.

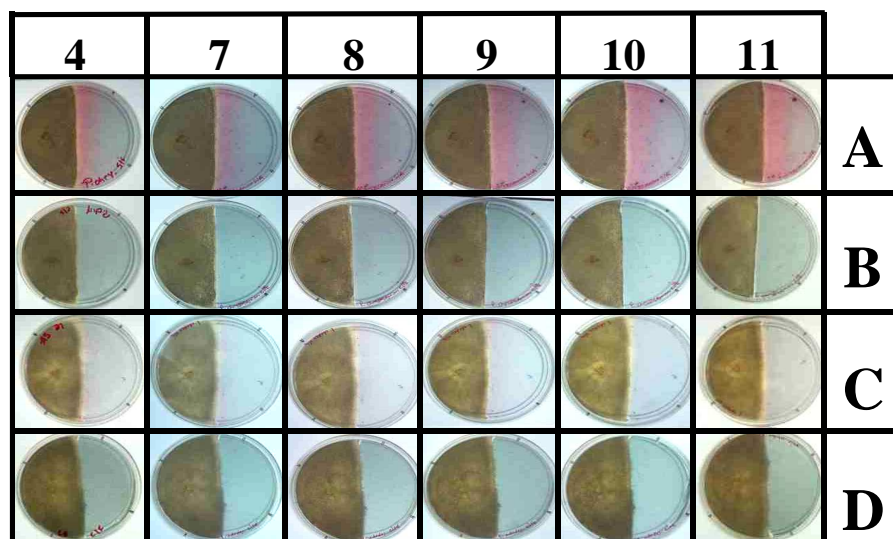


Figure 2, artigo: Production of iron-chelating compounds detected in plates using the CAS-agar plate modified method described by Milagres *et al.* (1999). (A) and (B) *P. chrysosporium* without or with the addition of 90 μM FeCl_3 , respectively. (C) and (D) *L. edodes* without or with the addition of 90 μM FeCl_3 , respectively. The numbers above the plates indicate the days of incubation. The increase in the production of iron-chelating compounds can be observed by the progressive color changing of the blue agar/CAS medium to pink and light pink for *P. chrysosporium* and for *L. edodes*, respectively.

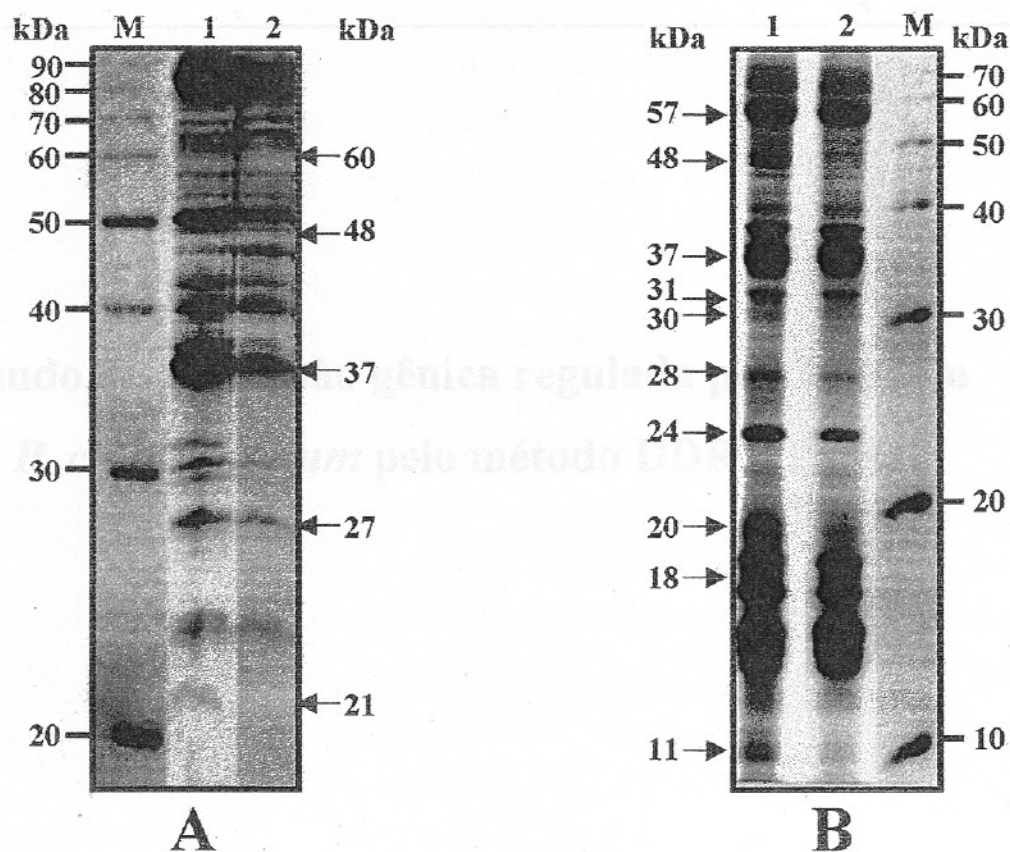


Figure 3, artigo: SDS-PAGE profiles of cellular proteins extracted from mycelia grown under iron deficiency (1) and sufficiency (2) in 2% agar-malt extract medium. Panel A: *P. chrysosporium*. Panel B: *L. edodes*. The arrows indicate induced proteins in iron-deficient profile; the numbers are estimated molecular weight. Traces and numbers beside the gels are values indicating the bands of protein molecular weight standard (M) in kDa (10 kDa Ladder, Gibco-BRL, Bethesda, USES)

Capítulo 2

**Estudo da expressão gênica regulada por ferro em
P. chrysosporium pelo método DDRT-PCR.**

1. Introdução

O método de *display* diferencial de mRNA (DD), desenvolvido por Liang & Pardee (1992) para o estudo da expressão de genes eucariotos tem se mostrado um método poderoso para a detecção e o isolamento de genes diferencialmente expressos, sendo que passados 10 anos do seu estabelecimento, mais de 3.800 publicações foram feitas utilizando esta metodologia (Liang, 1998; Stein & Liang, 2002; Ivanova & Ivanov, 2002).

Este método, também conhecido como DDRT-PCR (*Differential Display Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*), baseia-se na síntese de cDNA a partir de RNA total ou mRNAs expressos em duas situações diferenciais a serem comparadas, e na amplificação por PCR utilizando *primers* arbitrários (randômicos) e oligos (d)T. Os padrões gerados são comparados através da corrida das reações de amplificação lado a lado em gel de poliacrilamida. Desta forma, é possível a detecção de diferenças no padrão de expressão gênica entre duas ou mais condições. Os transcritos expressos diferencialmente podem ser excisados do gel, eluídos, reamplificados, clonados e sequenciados.

Em fungos, esta metodologia tem sido utilizada com sucesso no estudo de respostas celulares durante o desenvolvimento (Appleyard *et al.*, 1995; Leung *et al.*, 2000), ou ainda, face a agentes causadores de estresse (Iimura & Tatsumi, 1997; Miura *et al.* 2000; Ichinose *et al.*, 2002; Kurihara *et al.*, 2002). Em *Phanerochaete chrysosporium*, Kurihara *et al.* (2002) utilizaram o método para o estudo de genes responsivos ao estresse químico provocado dibenzo-*p*-dioxina, sendo identificados seis fragmentos de cDNA envolvidos na resposta ao estresse causado por este xenobiótico.

Desta forma, no presente estudo a técnica DDRT-PCR foi usada como estratégia para o estudo do papel do ferro na regulação de genes envolvidos na manutenção do metabolismo celular, na biodegradação da lignina, ou ainda, na biossíntese e/ou no transporte de sideróforos ou de outros quelantes de ferro, em fungos que degradam madeira, em especial na espécie *P. chrysosporium*. Para tanto, como condições diferenciais de crescimento foram feitos cultivos do micélio de *P. chrysosporium* em meio sem ou com suprimento de ferro (90 µM FeCl₃).

Os resultados obtidos neste estudo foram compilados no artigo apresentado a seguir e intitulado: **Iron-Responsive genes of *Phanerochaete chrysosporium* isolated by Differential Display Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction** (Assmann *et al.*, 2003).

Artigo 2

**Iron-Responsive genes of *Phanerochaete chrysosporium*
isolated by Differential Display Reverse Transcription
Polymerase Chain Reaction**

Environmental Microbiology 5: 777-786 (2003)

Iron-responsive genes of *Phanerochaete chrysosporium* isolated by differential display reverse transcription polymerase chain reaction

Eliana Maria Assmann,¹

Laura Maria Mariscal Ottoboni,¹ André Ferraz,²

Jaime Rodriguez³ and Maricilda Palandi de Mello¹

¹Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Caixa Postal 6010, 13083–970 Campinas, SP, Brazil.

²Departamento de Biotecnologia (DEBIO), Faculdade de Engenharia Química de Lorena (FAENQUIL), Caixa Postal 116, 12600–000 Lorena, SP, Brazil.

³Laboratório de Recursos Renovables, Universidad de Concepción, Casilla 160-C, Concepción, Chile.

Summary

White-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*, a ligninolytic basidiomycete, was studied to identify iron-responsive genes. Using the differential display reverse transcription PCR technique (DDRT-PCR), a total of 97 differentially expressed cDNA fragments were identified by comparing band intensities among fingerprints obtained from mycelia cultivated in iron-deficient and iron-replete media. Transcripts induced under iron-starvation exhibited homologies to: a modular polyketide synthase, a TonB protein, a probable transmembrane protein, a putative ABC transporter permease and a HSP70-related heat-shock protein. Modular polyketide synthase and TonB proteins are normally expressed under iron-starvation and are known to be involved in biosynthesis and transport of siderophores respectively. Also, a deduced protein with 96% similarity to a precursor of the well-known *P. chrysosporium* lignin peroxidase was identified under iron-deficiency. Two DDRT-PCR products confirmed their iron-induced expression. One was homologue to the CNOT3, which is a global regulator of RNA polymerase II transcription and has been implicated in multiple roles in the control of mRNA metabolism. The other was similar to the *Schizosaccharomyces pombe* putative proteasome

maturation factor upm1. In conclusion, the majority of iron-responsive *P. chrysosporium* transcripts isolated in the DDRT-PCR encode proteins involved in iron acquisition, especially members of biosynthesis and transport of iron chelators.

Introduction

Iron is one of the most abundant metals in nature and plays a key role in many cellular processes relying on proteins that incorporate iron-containing prosthetic groups and that participate in numerous cellular redox reactions but it can also be deleterious by accumulating and leading to the production of toxic hydroxyl free radicals. Therefore the production of iron-dependent cellular components is tightly regulated. To overcome the low bioavailability of this metal due to its low solubility at physiological pH, most organisms developed different mechanisms for efficient iron uptake. In general, bacteria and fungi secrete Fe(III) chelators, such as siderophores, which solubilize ferric iron and transport it into the cell (Braun and Killmann, 1999; Howard, 1999; Crosa and Walsh, 2002). Normally, the biosynthesis of such compounds is under regulation of an iron-induced repressor (Voisard *et al.*, 1993; Crosa and Walsh, 2002). The budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, which does not produce siderophores, has several pathways of iron transport including a low affinity transporter and a number of high affinity systems. One of these high affinity systems requires the reduction of Fe(III) to Fe(II) by plasma membrane reductases (Dancis *et al.*, 1990; Georgatsou and Alexandraki, 1994; Yun *et al.*, 2001). Another high affinity transport system is siderophore-mediated and depends on several homologous transporters of the major super-facilitator (MSF) family. All genes involved in the high affinity iron transport systems are under the control of iron-dependent transcription activators (Yun *et al.*, 2000; Blaiseau *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002; Yamaguchi-Iwai *et al.*, 2002).

In wood decay, iron plays a key role, being directly involved in the active sites of enzymes such as lignin peroxidases, Manganese-dependent peroxidases and cellobiose dehydrogenase. Iron binding compounds produced by wood-decaying basidiomycetes are responsible for cyclic redox systems that produces active oxygen spe-

Received 27 February, 2003; accepted 23 April, 2003. For correspondence: E-mail: mmello@unicamp.br; Tel: (+55) 19 3788 1146; Fax (+55) 19 3788 1089.

cies involved in polysaccharide depolymerization and lignin oxidation (Tanaka *et al.*, 1996; Goodell *et al.*, 1997; Paszczynski *et al.*, 1999; Ferraz *et al.*, 2001; Jensen *et al.*, 2001; Hammel *et al.*, 2002; Milagres *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 2003).

In *Phanerochaete chrysosporium*, a model white-rot fungi, iron regulation upon the expression of proteins has been recently reported and both SDS-PAGE and 2-DE differential profiles suggested that the production of lignin peroxidase is induced by iron-starvation (Hernández-Macedo *et al.*, 2002).

In this report, the differential display reverse transcription-PCR (DDRT-PCR) methodology, which is a successful technical approach to study cellular responses (Kurihara *et al.*, 2002; Paulino *et al.*, 2002), was used to evaluate the role of iron on the expression of genes that might be important for maintaining the cellular metabolism and/or that might be involved in the lignin biodegradation in the white-rot basidiomycete *P. chrysosporium*.

Results and discussion

Differential bands recognized in DDRT-PCR fingerprints

Phanerochaete chrysosporium iron-responsive genes were identified by comparison of iron-replete and iron-deficient growing conditions. Total RNAs from 10 day-old mycelia were templates to synthesize cDNAs using T₁₂NA, T₁₂NC or T₁₂NG as anchor primers. Differential display reverse transcription-PCRs were performed using four commercial arbitrary primers in combination to each of the three anchors. Several differential cDNAs bands identified on DDRT-PCR fingerprints are shown in Fig. 1. The technique was very efficient in identifying differential gene expression, as 97 partial cDNAs were isolated. Sixty-one and 36 bands were obtained in the absence and in the presence of iron respectively. Only reproducible bands were considered. A total of 63 DDRT-PCR products were successfully re-amplified and cloned. The distribution of the fragments according the primer used to isolate them and the alignment with proteins in database is shown in Table 1. For each of the 63 partial cDNAs, at least two clones were characterized. BLASTX analysis showed that 14 fragment sequences (11 iron-deficient; three iron-replete) aligned to hypothetical proteins and 24 (16 iron-deficient; eight iron-replete) did not present similarity to any sequence in the database. Whereas, 25 fragment sequences (18 iron-deficient; seven iron-replete) exhibited similarity to known proteins and were used as probes in Northern blots to confirm their expression. The relative amount of each transcript was estimated after normalization using the *P. chrysosporium* constitutive *gpd* gene as internal control. To obtain the expression time-course curves the same DDRT-PCR fragment and *gpd* gene were

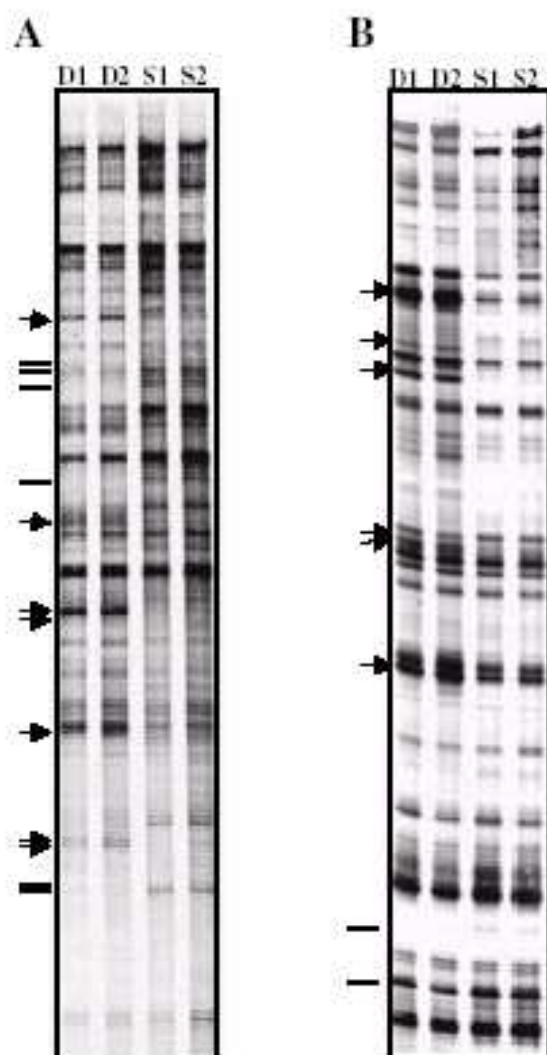


Fig. 1. DDRT-PCR fingerprints of RNA samples from *P. chrysosporium* mycelia cultured under iron-deficient (D) and iron-supplied (S) conditions. The fingerprints were obtained with (A) C5/T12NC and (B) OPJ-1/T12NA arbitrary/anchor primers. (1) and (2) represent duplicates. Arrows and lines on the left side of each autoradiograph indicate either iron-repressed or -induced bands respectively.

used as probes in at least two different Northern membranes. Two different washes (medium and high stringency) were performed and three different exposition times were obtained. The resulting time-course profiles given in percentage of expression were similar for each individual fragment. A positive hybridization signal was obtained for 17 fragments (68%). Although the protein similarities of eight non-hybridizing clones suggested that they play a role in processes such as oxidation or reduction reactions, and iron acquisition or metal transport, a low level of gene expression is probably responsible for the undetectable Northern blot signals. Actually, they

Table 1. Number of DDRT-PCR isolated cDNAs classified according to the iron-differential conditions and the arbitrary primers used.

Arbitrary primers	Iron-deficient condition					Iron-replete condition				
	No. of DDRT-PCR products	No. of clones	Protein similarities			No. of DDRT-PCR products	No. of clones	Protein similarities		
			Known	Hypothetical	None			Known	Hypothetical	None
OPJ-01	23	18	5	4	9	7	6	2	0	4
A2	9	6	4	0	2	11	6	4	0	2
A4	8	8	4	2	2	10	2	0	0	2
C5	21	13	5	5	3	8	4	1	3	0
Total	61	45	18	11	16	38	18	7	3	8

might be differentially expressed, as they were isolated in DDRT-PCR, which amplifies poorly expressed transcripts, but the low sensitivity of Northern blot limited their detection. Another possibility for poor hybridization signals observed in those cases could be that the probe recognizes an mRNA region which forms a complex secondary structure but this hypothesis was promptly discarded because the whole processes of both RNA gel separation and hybridization are performed under denaturing conditions. Nevertheless, a significant iron-responsive expression was observed for 15 DDRT-PCR products, 13 were induced under iron-deficiency and two under iron-sufficiency. Table 2 shows the results of similarity searches for the 17 clones that presented positive hybridization signals.

Sequences induced by iron-supply

Two out of the three fragments isolated from the iron-replete mycelia confirmed an iron-responsive expression at the 10th day of culture. The differential expression of fragment C5.18a was not confirmed under the experimental conditions despite its 56% similarity to a ferredoxin precursor that belongs to a family of [2Fe-2S] ferredoxins normally up-regulated by iron (Table 2). Northern blot analysis of fragments A2.12f and A4.16f is shown in Fig. 2A. To investigate gene expression during mycelia development, RNA from 3, 6 and 10 days of culture were blotted onto a membrane and hybridized to each fragment. After hybridization and quantitative analyses, the data were plotted (Fig. 2B). Kinetic profile of fragment A2.12f shows that there is an inversion of gene expression according iron conditions during mycelium development. At day 10 the expression is slightly higher in the iron-replete than in the iron-deficient mycelia, whereas at days 3 and 6 the transcription levels were significantly higher in the iron-deficient sample. A2.12f fragment showed strong homology with negative regulator of transcription 3 (CNOT3) of *Homo sapiens* homologue to yeast CCR4-NOT complex subunit. The CCR4-NOT protein complex is a global regulator of RNA polymerase II transcription and has been implicated in multiple roles in the control of mRNA metab-

olism, including initiation, elongation and degradation. In yeast, some of the genes that it affects are involved in non-fermentative growth, cell-wall integrity, metal ion-sensitive and cell-cycle regulations (Chen *et al.*, 2001). The CCR4-NOT regulates gene expression both positively and negatively. The repressive effects of the complex have been linked to restricting TBP (TATA-binding protein) access to non-canonical TATAA sequences, apparently through interaction with multiple TAF (TBP-associated factors) proteins. The isolation of an iron-regulated *P. chrysosporium* CNOT3 protein-homologue indicates an important role of iron upon mycelia development.

The fragment A4.16f was isolated and its iron-replete expression at day 10 was confirmed, although the highest level of transcription is observed at day 3. At this point the iron-deficient expression was 60% higher than the iron-replete. The deduced protein showed 57% similarity to a putative proteasome maturation factor Upm1 of *Schizosaccharomyces pombe*. The protein Upm1 is part of the proteasome precursor complexes and plays a crucial role in proteasome maturation in *S. cerevisiae*. Ump1 was identified as a type of molecular chaperone, a short-lived maturation factor required for efficient biogenesis of the 20S proteasome (Ramos *et al.*, 1998). The 20S proteasome is the proteolytically active core of 26S proteasome which are multisubunit protease complexes engaged in the turnover of short-lived proteins that regulate a variety of cellular processes including signal transduction, stress response, transcriptional control, chromosome segregation, DNA repair and cell cycle progression (Hershko and Ciechanover, 1998). Recently, a proteasome-mediated pathway was shown to be involved in the regulation of ligninolytic activities in white-rot fungi upon nitrogen and carbon starvation (Staszczak, 2002).

Sequences induced by iron-deficiency

Thirteen fragments isolated from the iron-deficient mycelia confirmed an iron-responsive expression at the 10th day of culture. To investigate gene expression during mycelia development, total RNA from 3, 6 and 10-day cultures were blotted onto a membrane and hybridized to each

Table 2. Sequence analysis of DDRT-PCR products with similarity to GenBank sequences.

DDRT-PCR products	Iron condition ^a	Arbitrary/anchor primers	Band size (bp) ^b	Transcript size (bp) ^c	Proteins (accession number)	Identity (%)	Similarity (%)	Score (bits), E-value
C5.18a	R	C5/T12NC	220	2400	Ferredoxin precursor <i>Feathermanas lentana</i> (P34808)	28	56	30, 8.1
A2.12f	R	A2/T12NC	460	790	CNOT3 (NP_056331) <i>H. sapiens</i>	63	76	130, 3e-30
A4.16f	R	A4/T12NC	320	526	Putative proteasome maturation factor upm1 <i>Schizosaccharomyces pombe</i> (O74416)	35	57	35, 0.72
A4.10e	D	A4/T12NG	420	540	Modular polyketide synthase <i>Streptomyces avermitilis</i> (BA000217)	29	40	34, 1.0
C5.4e	D	C5/T12NA	270	2760	TonB protein <i>Rhizobium leguminosarum</i> (AJ310723)	38	59	33, 0.75
C5.9c	D	C5/T12NC	310	1230	Probable transmembrane protein <i>Raktonia solanaceum</i> (NP_520201)	32	47	32, 1.4
C5.26d	D	C5/T12NG	340	780	Putative ABC transporter permease <i>Sinorhizobium meliloti</i> (NP_438045)	29	44	30, 9.2
1.1	D	OPJ01/T12NA	280	1200	Ligninase LG5 precursor <i>Phanerochaete chrysosporium</i> (P11543)	94	96	70, 9e-12
4.4	D	OPJ01/T12NC	300	2400	hypothetical protein <i>R. metallidutans</i> (ZP_00024199)	39	46	31, 3.8
11b	D	OPJ01/T12NG	420	1060	Unknown protein <i>Mycoplasma genitalium</i> (AAD10590)	61	61	32, 5.4
13a	D	OPJ01/T12NG	340	2030	Taurine ATP-binding transport system component <i>Escherichia coli</i> K12 (NP_414500)	25	41	33, 1.2
A2.10c	D	A2/T12NA	570	2295	Sprouty homologue 1 (Spry-1) <i>Homo sapiens</i> (O43609)	39	51	33, 2.6
A2.7e	D	A2/T12NC	570	2310	Spry-1 <i>H. sapiens</i> (O43609)	43	56	37, 0.037
A2.1e	D	A2/T12NC	620	3150	Spry-1 <i>H. sapiens</i> (O43609)	43	56	39, 0.042
A2.16a	D	A2/T12NG	400	2980	Related to Hsp70 protein <i>Neurospora crassa</i> (CA001447)	42	61	43, 0.003
A4.14a	D	A4/T12NG	320	1660	Putative transcription factor flilb component <i>Schizosaccharomyces pombe</i> (NP_588406)	39	60	32, 1.5
C5.12a	D	C5/T12NC	320	1630	CeuE <i>Campylobacter coli</i> (X88840)	50	63	31, 7.8

a. R = iron-replete and D = iron-deficient growth condition.

b. DDRT-PCR band sizes based on 1 kb DNA Ladder (Invitrogen) used as molecular marker in the fingerprints.

c. Transcript sizes estimated in Northern blot analyses based on 0.15–1.77 kb RNA Ladder (Invitrogen) used as molecular marker on RNA gels. These sequence data have been submitted to the CDBJ/EMBL/GenBank databases under accession numbers: AJ543744, AJ543745, AJ543746, AJ543747, AJ543748, AJ543749, AJ544591, AJ544592, AJ544593, AJ544597, AJ544598, AJ544599, AJ544600, AJ544601, AJ543747, AJ543750, AJ543745.

isolated fragment. C5.12e exhibited 63% similarity to the CeuE *Campylobacter coli* protein that is a periplasmic substrate-binding protein of an operon responsible for the uptake of a ferric siderophore (Richardson and Park, 1995). Despite this interesting similarity, the differential expression could not be confirmed because the hybridization signals on both iron-deficient and iron-replete lanes were too weak to be properly quantified. Fragments A4.10e, C5.4e, C5.9c and C5.26d presented interesting similarities that will be discussed below. The Northern blots and the quantitative analysis for these transcripts are shown in Fig. 3A and B. The A4.10e kinetic curves indicate that the gene is transcribed in both conditions at day 6 but

the level of expression was two times higher in the iron-deficient than in the iron-replete media. Conversely, at day 10 the transcription under iron-supply drastically drops whereas it increases continuously under iron-deficiency. The iron-replete curve for C5.4e shows slight slope linear increase during the 10 days of culture whereas iron-deficient transcription increases significantly at day 10. Although a higher expression was confirmed for transcript C5.9c in iron-deficient mycelia at day 10, the transcription level at day 6 was higher for samples grown under iron-supply. These results demonstrate that the transcription of this gene follows different iron-responses during development. During the 10-day period, C5.26d transcribes with

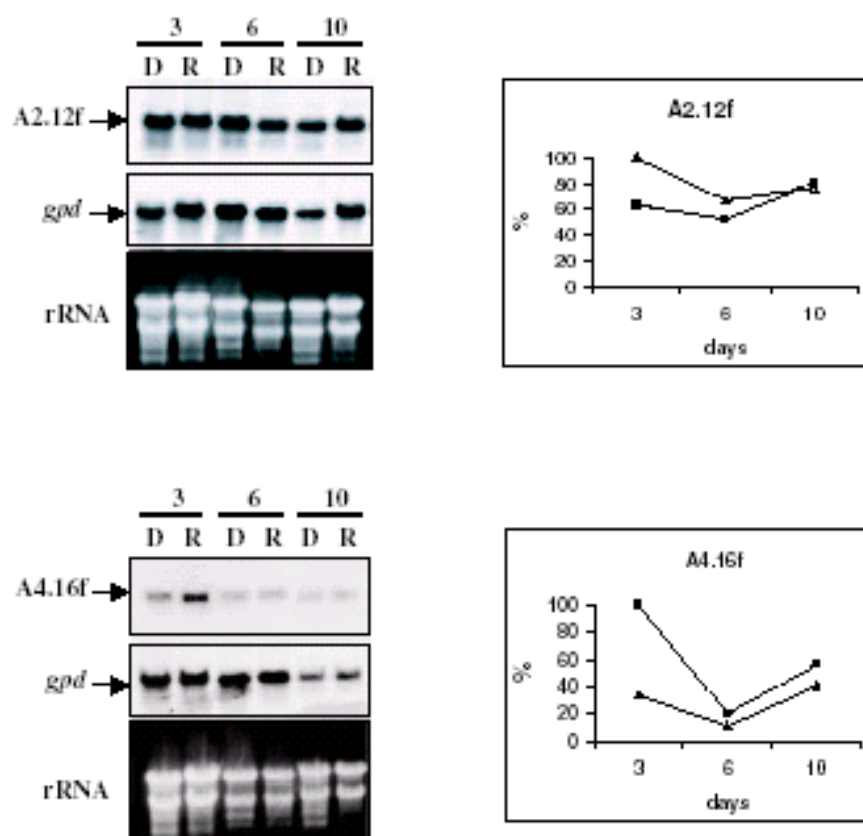


Fig. 2 A. Northern blot analyses during time-course of culture for transcripts induced under iron-supply condition. For each fragment, a set of three figures corresponding to autoradiograph of fragment hybridization result, the same membrane after *gpd* hybridization and the ethidium bromide stained rRNA in the original agarose gel are presented as indicated by the arrows on the left side of figures. Numbers above each set indicate RNA from 3, 6 and 10 days of culture. For each day-point, mycelia from both iron-deficient (D) and iron-supply (S) cultures were loaded. B. Curves obtained after quantitative analyses for transcripts indicated on the top of each graph. Δ, RNA obtained from mycelia grown in iron-deficient media; ■, RNA obtained from mycelia grown in iron-replete media.

similar kinetics showing a maximum at day 6 in both conditions, except that the transcription levels were 1.5 times higher in mycelia cultivated under iron-deficiency.

The BLASTX analysis showed that deduced protein derived from A4.10e sequence (Table 2) aligned to a modular polyketide synthase (PKS) of *Streptomyces avermitilis*, which is suggested to be involved in the biosynthesis of desferrioxamine derivatives and is commonly associated with the production of highly reduced metabolites (Omura *et al.*, 2001). In general synthetases have been characterized as part of bacterial siderophore biosynthesis operons (Crosa, 1997). In *Ustilago maydis*, a basidiomycete, two genes for siderophore biosynthesis were described. The *sid1* encode the L-ornithine N5-oxygenase, which catalyses the hydroxylation of L-ornithine, the first step of siderophore biosynthesis (Mei *et al.*, 1993). The second gene, *sid2* encode a multifunctional non-ribosomal peptide synthetase, which is induced in a low-

iron medium (Yuan *et al.*, 2001). The iron-response and the homology presented by fragment A4.10e to such a modular polyketide synthase indicate that it can be the *P. chrysosporium* homologue involved in siderophore-like compound biosynthesis.

The deduced protein derived from fragment C5.4e presented 48% of similarity to the TonB protein of *Rhizobium leguminosarum*. TonB is a cytoplasmic membrane protein that spans the periplasmic space of cell envelope to transduce cytoplasmic membrane-derived energy to the outer membrane receptors of Gram-negative bacteria to allow active transport of iron siderophores and vitamin B12 (Moeck and Coulton, 1998; Braun and Kilmann, 1999). In addition, *tonB* transcription is enhanced in low-iron conditions. This result permits to suggest the existence of a similar siderophore-based high-affinity transport mechanism for iron uptake involving a TonB-like protein in *P. chrysosporium*.

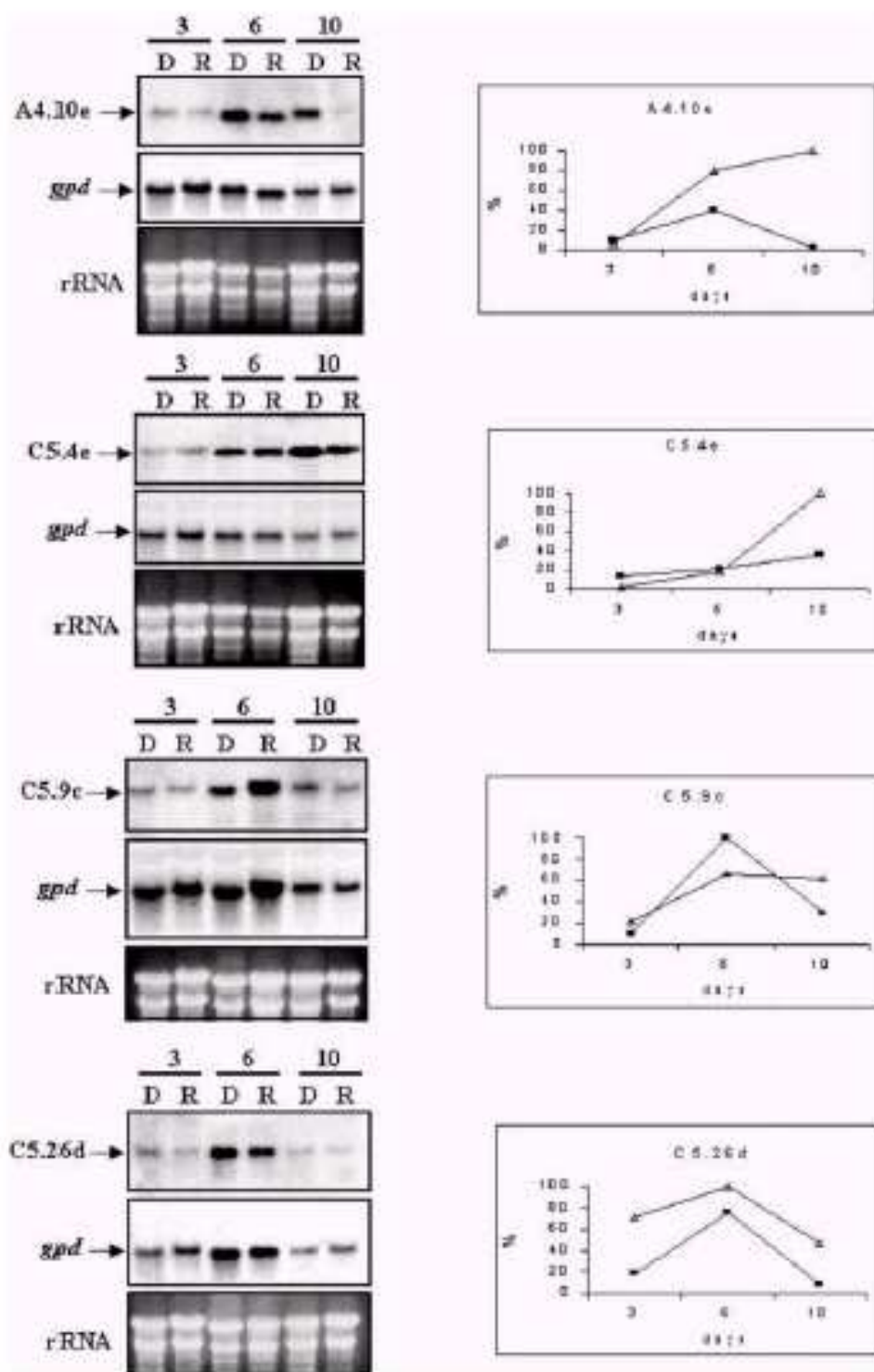


Fig. 3. A. Northern blot analyses during time-course of culture for transcripts induced under iron-starving condition. For each fragment, a set of three figures corresponding to: autoradiograph of fragment hybridization result, the same membrane after *gpd* hybridization and the ethidium bromide stained rRNA in the original agarose gel are presented as indicate by the arrows on the left side of figures. Numbers above each set indicate RNA from 3, 6 and 10 days of culture. For each day-point, mycelia from both iron-deficient (D) and iron-supply (S) cultures were loaded. B. Curves obtained after quantitative analyses for transcripts indicated on the top of each graph. Δ, RNA obtained from mycelia grown in iron-deficient media; ■, RNA obtained from mycelia grown in iron-replete media.

The BLASTX result for C5.9c fragment showed similarity with a probable transmembrane protein of *Ralstonia solanaceum*. The function of this protein has not been evaluated because its sequence was generated by genome project annotation. As transmembrane proteins compose several transport systems such as the major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport transport (Marger and Saier, 1993). C5.9c clone may encode a protein involved in the transport of a wide variety of solutes. The deduced protein from C5.26d was 44% similar to a putative ABC transporter permease of *Sinorhizobium meliloti*. This gene is part of a regulon that possesses sequences to a high-affinity siderophore iron transport system and two clusters of putative iron transporter genes (Angerer *et al.*, 1992; Mademidis *et al.*, 1997; Dugourd *et al.*, 1999; Wyckoff *et al.*, 1999; Barnett *et al.*, 2001; Gong *et al.*, 2001). In fungi, the ABC transporter system has been described to be involved in pleiotropic drug resistance, stress response and cellular detoxification (Zwiers and De Waard, 2000; Wolfger *et al.*, 2001).

Three different DDRT-PCR products (Table 2, A2.1e, A2.7e, A2.10c) presented similarity to the human Spry-1 protein. Interestingly, these fragments showed almost identical nucleotide sequence and similar kinetic profile being 40% increased in the iron-deficient samples in both 6- and 10-day cultures (data not shown). Sprouty in *Drosophila melanogaster* encodes a cysteine-rich protein that defines a new family of putative signalling molecules that may similarly function as fibroblast growth factor antagonists in vertebrate development (Hacohen *et al.*, 1998). In humans, sprouty-1 and -2 are membrane-anchored phosphoprotein inhibitors of growth factor signalling in endothelial cells that negatively regulate angiogenesis-associated receptor tyrosine kinase signalling (Impagnatiello *et al.*, 2001).

The fragment A2.16a is poorly transcribed but at day 10 its expression was threefold higher in the absence than in the presence of iron (data not shown). The BLASTX analysis showed that the deduced protein was 61% similar to a protein related to Hsp70 of *Neurospora crassa*. It is interesting to mention that in yeast, the minor Hsp70 chaperone of mitochondrial matrix has been linked to iron metabolism and assembly or repair of Fe/S cluster (Schilke *et al.*, 1999).

In summary, most iron-starving induced transcripts presented similarities to transport membrane proteins indicating that different mechanisms of iron-uptake, including a siderophore-mediated one, are probably activated in *P. chrysosporium*. Another finding that can support the hypothesis of an iron-starving inducible siderophore-mediated iron-uptake in the white-rot fungus was the identification of a transcript homologous to a polyketide synthase. The isolation of complete cDNA of transcripts

that showed similarities to proteins involved in both biosynthesis and transport of iron chelators and the investigation of their expression under natural wood conditions will contribute to a proper characterization of their function in iron uptake processes of *P. chrysosporium*.

Finally, iron-deficiency induced an OPJ-1 fragment that showed 96% similarity to GLG5 lignin peroxidase precursor of *P. chrysosporium* (Table 2, clone 1.1). Ten closely related genes clustered in three linkage groups encode lignin peroxidases in *P. chrysosporium* (Conesa *et al.*, 2002). It is known that LiP genes express in response to limiting amounts of carbon, nitrogen or sulphur during secondary metabolism (Kirk and Farrell, 1987). Also, the intracellular cAMP level appears to be important in regulating the production of LiPs (Reddy and D'Souza, 1994). An iron-regulation upon the expression of LiPs in *P. chrysosporium* was suggested in a previous study after evaluating iron-responsive proteins in SDS-PAGE and 2-DE profiles (Hernández-Macedo *et al.*, 2002). The result presented here confirms that the expression of LiP genes, which play an important role in *P. chrysosporium* lignin degradation, is iron-regulated. In conclusion, this study identified important genes involved in iron-regulated mechanisms in the wood degrading fungus *P. chrysosporium* and highlight the importance of further characterization of entire gene sequence corresponding to each transcript to make a deeper discussion about the role of iron in the expression of those genes and their importance to the metabolism of the fungus and/or their possible involvement in the wood degradation process.

Experimental procedures

Fungal strain and culture conditions

Phanerochaete chrysosporium BKM 1767 was grown in 250 ml Erlenmeyer flasks containing 75 ml of 2% malt-extract broth (ME) (DIFCO, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA), using two iron conditions. Differential growth conditions were: (i) ME medium (iron-deficient) and (ii) ME medium containing 90 µM FeCl₃ (iron-replete). To remove iron traces, all glassware were dipped in 1.2 M HCl for 48 h, autoclaved at 1 atm for 20 min with 0.1% EDTA, rinsed and autoclaved again with deionised water. Cultures were incubated at 28°C under air atmosphere and shaking (120 r.p.m.) for 10 days. Mycelia were separated from the medium by filtration, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

RNA isolation

Mycelium total RNA was isolated as described by Sokolovsky *et al.* (1995) with minor modifications. Mycelia were grounded to a fine powder in liquid nitrogen. To the powdered mycelia 0.75 ml lysis buffer (0.6 M NaCl, 10 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8.0 and 4% SDS) and an equal volume of phenol saturated with 0.1 M Tris-HCl pH 7.4 were added. After sep-

arating the aqueous phase, a second phenol extraction was performed. To the upper phase, 0.75x volumes of 8 M LiCl were added and the mixture was incubated overnight at -20°C . After centrifugation, the pellet was resuspended in 0.3 ml water and 0.3 M final concentration of sodium acetate pH 5.2 was added. Finally, the RNA was precipitated by adding 2.5 times the volume of ethanol. The RNA was then resuspended in diethylpyrocarbonate-treated deionised water. RNA samples were treated with DNase for 1 h at 37°C and stored at -80°C .

Differential display reverse transcription-PCR

The DDRT-PCR experiments were performed as described by Liang and Pardee (1992), with minor modifications. Arbitrary primers were: OPJ-1 (Operon Technologies, Alabama, CA, USA), A2 and A4 (Set A, Stratagene, La Jolla, CA, USA) and C5 (Set C, Stratagene, La Jolla, CA, USA). The first strand cDNA was synthesized in a standard reverse transcription reaction incubating 200–500 ng total RNA with $10\ \mu\text{M}$ T₁₂NA or T₁₂NG primers for 10 min at 68°C in $10\ \mu\text{l}$ volume. After this initial incubation, the reactions were performed in a final volume of $20\ \mu\text{l}$ containing 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 U RNAGuard ribonuclease inhibitor human placenta (Amersham Biosciences), 10 mM DTT, 100 mM of each 2'-deoxynucleoside 5'-triphosphate (dNTPs) and 100 U SuperscriptTM II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (InvitrogenTM) and the mixture was incubated at 37°C for 50 min. To inactivate the enzyme the reaction was heated at 95°C for 5 min. For the second-strand synthesis, $4\ \mu\text{l}$ of the first-strand reaction was added to a mixture containing $1\times$ PCR buffer (InvitrogenTM), 1.25 mM MgCl₂, $2\ \mu\text{M}$ of the same arbitrary primer used in the first-strand synthesis, $2\ \mu\text{M}$ of each dNTPs, $1\ \mu\text{Ci}$ of [α -³²P]-dATP (Amersham Biosciences) and 1.5 U of Taq DNA Polymerase (Amersham Biosciences) in a $20\ \mu\text{l}$ reaction. All PCRs were done in duplicate and performed in a Perkin-Elmer 2400 thermal cycler (Norwalk, CT, USA). The amplification conditions included an initial denaturation step at 94°C for 5 min, followed by 40 cycles at 94°C for 30 s, 40°C for 2 min and 72°C for 30 s. Seven μl from each reaction were mixed to $5\ \mu\text{l}$ of a solution containing 80% deionised formamide, 0.01% bromophenol blue and 0.01% xylene cyanol. The samples were incubated at 80°C for 5 min and $8\ \mu\text{l}$ were loaded on a 6% polyacrylamide gel containing 42% urea and the electrophoresis was performed in a Hoefer SQ3 Sequencer (Amersham Biosciences) at 1320 V and 35 mA. Duplicates for each iron condition were loaded side by side on denaturing gels to guarantee reproducibility. The gel was blotted onto Whatman 3MM and dried under vacuum. Differential display profiles were revealed on Kodak X-OMAT-AR autoradiography. To isolate differential cDNAs, the DDRT-PCR bands were excised and eluted by incubation at 95°C for 20 min in $200\ \mu\text{l}$ deionised water and precipitated with 0.3 M NaCl and 2 volumes of ethanol. After centrifugation cDNA was resuspended in $20\ \mu\text{l}$ deionised water. Four μl of the eluted band were re-amplified in a $40\ \mu\text{l}$ PCR mixture containing $1\ \mu\text{M}$ of the same primers that generated the fingerprint. The amplification cycles were performed as described before. Fragments were cloned into the pGEM-T easy vector (Promega, Madison, WI,

USA), according to the manufacturer's specifications. Two to five clones from each band were sequenced in an ABI PRISMTM 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The results were compared to GenBank sequences using the BLASTX function of BLAST algorithm, version 2.2.1 (Altschul et al., 1997).

Northern blot analysis

Phanerochaete chrysosporium mycelia were grown in the absence and presence of iron for 3, 6 and 10 days. Approximately equal amounts of total RNA were denatured in 5% formaldehyde solution containing 40% deionised formamide for 15 min at 60°C and were fractionated on a denaturing gel (1.0% agarose, 1.8% formaldehyde) with $1\times$ N-Morpholinol propanesulphonic acid buffer (MOPS) pH 7.0 ($10\times$ MOPS = 0.2 M MOPS; 10 mM EDTA pH 8.0; 50 mM sodium acetate pH 5.2). The RNA was transferred to a nylon membrane (Hybond-N⁺, Amersham Biosciences) using $2\times$ SSC ($20\times$ SSC = 3 M sodium chloride and 0.3 M sodium citrate) and fixed at 80°C for 2 h. The membranes were prehybridized for 3–4 h in 50% deionised formamide, $5\times$ SSC, $5\times$ Denhardt's (0.1% polyvinylpyrrolidone, 0.1% ficoll 400, 0.1% BSA), 50 mM sodium phosphate pH 7.2, 1% SDS and $100\ \mu\text{g}$ of denatured salmon sperm DNA ml⁻¹. Approximately 25–100 ng of each cloned cDNA were labelled with [α -³²P]-dCTP using RadPrime Labeling DNA System (InvitrogenTM), denatured with 0.3 N NaOH and used as probes. The hybridization was performed overnight in 50% deionised formamide, $5\times$ SSC, 20 mM phosphate buffer pH 7.2, 1% SDS, 5% dextran sulphate and the denatured probe. Prehybridization and hybridization were carried out at 42°C . After hybridization, the membranes were initially washed with $2\times$ SSC and 0.5% SDS for 15 min at room temperature, then high stringency washes were repeated twice at 55°C with $0.1\times$ SSC and 0.5% SDS for 15 min. For each fragment a second hybridization procedure was performed at the same conditions described above, except that the stringency of final washes was lowered ($1.0\times$ SSC and 0.5% SDS at 50°C for 15 min). The membranes were exposed to Kodak X-OMAT films for three different exposition times. As a control, the constitutively expressed glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (*gpd*) of *P. chrysosporium* (Harmsen et al., 1992) was used as probe. The hybridization signals were quantified using the Kodak Digital Science-1D Image Analysis Software vs. 2.0.3 (Eastman Kodak Company, NY, USA).

Acknowledgements

This research was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), São Paulo, SP, Brazil (grants n°: 98/00548–4 to M. P. de M., and 97/14314–2 to E. M. A.). We also thank Maria Madalena Vasconcelos Rosa (Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil) for technical support.

References

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J.,

- Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389–3402.
- Angerer, A., Klupp, B., and Braun, V. (1992) Iron transport systems of *Senecio mantesensis*. *J Bacteriol* 174: 1378–1387.
- Barnett, M.J., Fisher, R.F., Jones, T., Komp, C., Abola, A.P., Barkley-Hubler, F., et al. (2001) Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 9883–9888.
- Blaiseau, P.-L., Lesuisse, E., and Camadro, J.-M. (2001) Aft2p, a novel iron-regulated transcription activator that modulates, with Aft1p, intracellular iron use and resistance to oxidative stress in yeast. *J Biol Chem* 276: 34221–34226.
- Braun, V., and Kilmann, H. (1999) Bacterial solutions to the iron-supply problem. *TIBS* 24: 104–109.
- Chen, J., Rappelber, J., Chiang, Y.C., Russell, P., Mann, M., and Denis, C.L. (2001) Purification and characterization of the 1.0 MDa CCR4-NOT complex identifies two novel components of the complex. *J Mol Biol* 314: 683–694.
- Conesa, A., Punt, P.J., and van den Hondel, C.A. (2002) Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. *J Biotechnol* 93: 143–158.
- Crosa, J.H. (1997) Signal transduction and transcriptional and posttranscriptional control of iron-regulated genes in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 61: 319–336.
- Crosa, J.H., and Walsh, C.T. (2002) Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 66: 223–249.
- Dancis, A., Klausner, R.D., Hinnebusch, A.G., and Bartolucci, J.G. (1990) Genetic evidence that ferric reductase is required for iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 10: 2294–2301.
- Dugourd, D., Martin, C., Ricou, C.R., Jacques, M., and Harel, J. (1999) Characterization of a periplasmic ATP-binding cassette iron import system of *Brachyspira* (Serpulina). *Hydroxyenteriae J Bacteriol* 181: 6948–6957.
- Fertaz, A., Parra, C., Freer, J., Baeza, J., and Rodriguez, J. (2001) Occurrence of iron-reducing compounds in biodegraded 'palo podrido' wood samples. *Int Biodegrad Biodegradat* 47: 203–208.
- Georgakou, E., and Alexandraki, D. (1994) Two distinctly regulated genes are required for ferric reduction, the first step of iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 14: 3065–3073.
- Gong, S., Bearden, S.W., Geoffroy, V.A., Feltham, J.D., and Perry, R.D. (2001) Characterization of the *Yersinia pestis* Ytu ABC inorganic iron transport system. *Infect Immun* 67: 2829–2837.
- Goodell, B., Jellison, J., Liu, J., Daniel, G., Paszczynski, A., Fekete, F., et al. (1997) Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolated from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood. *J Biotechnol* 53: 133–152.
- Hacohen, N., Kramer, S., Sutherland, D., Hiromi, Y., and Krasnow, M.A. (1998) Sprouty encodes a novel antagonist of FGF signaling that patterns apical branching of the *Drosophila* airways. *Cell* 92: 253–263.
- Hammel, K.E., Kapich, A.N., Jensen, K.A., and Ryan, Z.C. (2002) Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. *Enzyme Microbiol Technol* 30: 445–453.
- Harmsen, M.C., Schuren, F.H., Moukha, S.M., van Zullien, C.M., Punt, P.J., and Wessels, J.G.H. (1992) Sequence analysis of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes from the basidiomycetes *Schizophyllum commune*, *Phanerochaete chrysosporium* and *Agaricus bisporus*. *Curr Genet* 22: 447–454.
- Hernández-Macedo, M.L., Ferraz, A., Rodríguez, J., Otioboni, L.M., and De Mello, M.P. (2002) Iron-regulated proteins in *Phanerochaete chrysosporium* and *Lentinula edodes*: differential analysis by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis profiles. *Electrophoresis* 23: 655–661.
- Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67: 425–479.
- Howard, D.H. (1999) Acquisition, transport, and storage of iron by pathogenic fungi. *Clin Microbiol Rev* 12: 394–404.
- Impagnatello, M.A., Weltzer, S., Gannon, G., Compagni, A., Collen, M., and Christofori, G. (2001) Mammalian sprouty-1 and -2 are membrane-anchored phosphoprotein inhibitors of growth factor signaling in endothelial cells. *J Cell Biol* 152: 1087–1098.
- Jensen, K.A., Houtman, C.J., Ryan, Z.C., and Hammel, K.E. (2001) Pathways for extracellular Fenton chemistry in the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. *Appl Environ Microbiol* 67: 2705–2711.
- Kim, Y., Yun, C.-W., and Philpott, C.C. (2002) Ferrichrome induces endosome to plasma membrane cycling of the ferrichrome transporter, Arn1p. *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 21: 3632–3642.
- Kirk, T.K., and Farrell, R.L. (1987) Enzymatic 'combustion': the microbial degradation of lignin. *Annu Rev Microbiol* 41: 455–505.
- Kurihara, H., Waritshi, H., and Tanaka, H. (2002) Chemical stress-responsive genes from the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* exposed to dibenzo-p-dioxin. *FEMS Microbiol Lett* 212: 217–220.
- Liang, P., and Pardee, A.B. (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257: 967–971.
- Mademidis, A., Kilmann, H., Kraas, W., Rechsler, I., Jung, G., and Braun, V. (1997) ATP-dependent ferric hydroxamate transport system in *Escherichia coli*: periplasmic FhuD interacts with a periplasmic and with a transmembrane/cytoplasmic region of the integral membrane protein FhuB, as revealed by competitive peptide mapping. *Mol Microbiol* 25: 1109–1123.
- Marger, M.D., and Sailer, M.H. (1993) A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyze uniport, symport and antiport. *Trends Biochem Sci* 18: 13–20.
- Met, B., Budde, A.D., and Leong, S.A. (1993) sid1, a gene initiating siderophore biosynthesis in *Ustilago maydis*: molecular characterization, regulation by iron, and role in phytopathogenicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 903–907.
- Milagres, A.M.F., Arantes, V., Medeiros, C.L., and Machuca, A. (2002) Production of metal chelating compounds by white and brown-rot fungi and their comparative abilities for pulp bleaching. *Enzyme Microbiol Technol* 30: 562–565.
- Moock, G.S., and Coulton, J.W. (1998) TonB-dependent iron

- acquisition: mechanisms of siderophore-mediated active transport. *Mol Microbiol* 28: 675–681.
- Omura, S., Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Takahashi, C., Shinose, M., *et al.* (2001) Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 12215–12220.
- Paszczynski, A., Crawford, R., Funk, D., and Goodell, B. (1999) De novo synthesis of 4,5-dimethoxycatechol and 2,5-dimethoxyhydroquinone by the brown rot fungus *Gloeophyllum trabeum*. *Appl Environ Microbiol* 65: 674–679.
- Paulino, L.C., De Mello, M.P., and Ottoboni, L.M. (2002) Differential gene expression in response to copper in *Acidithiobacillus ferrooxidans* analyzed by RNA arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Electrophoresis* 23: 520–527.
- Ramos, P.C., Hockendorf, J., Johnson, E.S., Varshavsky, A., and Dohmen, R.J. (1998) Ump1p is required for proper maturation of the 20S proteasome and becomes its substrate upon completion of the assembly. *Cell* 92: 489–499.
- Reddy, C.A., and D'Souza, T.M. (1994) Physiology and molecular biology of the lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiol Rev* 13: 137–152.
- Richardson, P.T., and Park, S.F. (1995) Enterobactin acquisition in *Campylobacter coli*: characterization of components of a binding-protein-dependent transport system. *Microbiology* 141: 3181–3191.
- Rodríguez, J., Ferraz, A., and De Mello, M.P. (2003) Role of metals in wood biodegradation. In *ACS Symposium Series 845: Wood Deterioration and Preservation: Advances in our Changing World*. Goodell, B., Nicholas, D.D. and Schultz, T.P. (eds). American Chemical Society Washington D.C., Portland: Oxford University Press, pp. 154–174.
- Schilke, B., Volsine, C., Belnerl, H., and Craig, E. (1999) Evidence for a conserved system for iron metabolism in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 10206–10211.
- Sokolovsky, V., Kaldenhoff, R., Ricci, M., and Russo, V.E.A. (1995) Fast and reliable mini-prep RNA extraction from *Neurospora crassa*. [WWW document]. URL <http://www.tgsc.net/tgcr37/sokol.html>.
- Staszczak, M. (2002) Proteasomal degradation pathways in *Trameetes versicolor* and *Phlebia radiata*. *Enzyme Microbiol Technol* 30: 537–541.
- Tanaka, H., Itakura, S., Hirano, T., and Enoki, A. (1996) An extracellular substance from the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* for reducing molecular oxygen and ferric iron. *Holzforschung* 50: 541–548.
- Volzard, C., Wang, J., McEvoy, J.L., Xu, P., and Leong, S.A. (1993) *urbs1*, a gene regulating siderophore biosynthesis in *Ustilago maydis*, encodes a protein similar to the erythroid transcription factor GATA-1. *Mol Cell Biol* 13: 7091–7100.
- Wolter, H., Mammun, Y.M., and Kuchler, K. (2001) Fungal ABC proteins: pleiotropic drug resistance, stress response and cellular detoxification. *Res Microbiol* 152: 375–389.
- Wyckoff, E.E., Valle, A.M., Smith, S.L., and Payne, S.M. (1999) A multifunctional ATP-binding cassette transporter system from *Vibrio cholerae* transports vibriobactin and enterobactin. *J Bacteriol* 181: 7589–7596.
- Yamaguchi-Hwai, Y., Ueda, R., Fukunaka, A., and Sasaki, R. (2002) Subcellular localization of Aft1 transcription factor responds to iron status in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 277: 18914–18918.
- Yuan, W.M., Genill, G.D., Budde, A.D., and Leong, S.A. (2001) Characterization of the *Ustilago maydis* *sid2* gene, encoding a multidomain peptide synthetase in the ferriochrome biosynthetic gene cluster. *J Bacteriol* 183: 4040–4051.
- Yun, C.-W., Ferea, T., Rashford, J., Ardon, O., Brown, P.O., Botstein, D., *et al.* (2000) Desferrioxamine-mediated iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence for two pathways of iron uptake. *J Biol Chem* 275: 10709–10715.
- Yun, C.-W., Bauler, M., Moore, R.E., Klebba, P.E., and Philpott, C.C. (2001) The role of the FRE family of plasma membrane reductases in the uptake of siderophore-iron in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 276: 10218–10223.
- Zwiers, L.H., and De Waard, M.A. (2000) Characterization of the ABC transporter genes *MgAtr1* and *MgAtr2* from the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Fungal Genet Biol* 30: 115–125.

Capítulo 3

**Isolamento de genes utilizando *primers* degenerados
baseados em domínios conservados dos fatores de
transcrição da família GATA**

1. Introdução

Os fatores de transcrição GATA formam uma classe de reguladores transcricionais presentes em fungos, metazoários, animais e plantas. As proteínas da família GATA são caracterizadas por reconhecerem um sítio alvo no DNA de seis pb, conhecido como elemento de consenso GATA, cuja sequência é HGATAR (Scazzocchio, 2000). Em todas as proteínas GATA o domínio de ligação à sequência de DNA consenso é formado por um ou dois motivos dedo de zinco do tipo Cis_2/Cis_2 (Scazzocchio, 2000) e um *loop* central de tamanho variável, em geral com 17 ou 18 aminoácidos, o qual é requerido para o reconhecimento da sequência GATA no DNA. O domínio de ligação ao DNA é altamente conservado entre todas as proteínas GATA (Omichinski *et al.*, 1993). Em fungos, os fatores GATA participam na regulação do metabolismo de nitrogênio, na indução de genes que respondem à luz, na biossíntese de sideróforos e na determinação do *mating-type* (Scazzocchio, 2000).

Em fungos basidiomicetos os estudos de genes envolvidos com a biossíntese de sideróforos têm avançado. No fungo fitopatogênico *Ustilago maydis* que sintetiza o ferricromo e o ferricromo A, três genes envolvidos na biossíntese, foram isolados e caracterizados, sendo os genes *sid1* (Wang *et al.*, 1989; Mei *et al.*, 1993; Leong & Winkelmann, 1998), *sid2* (Yuan *et al.*, 2001) e *urbs1* (Voisard *et al.*, 1993; An *et al.*, 1997a, b). O gene *urbs1* (*U. maydis* *regulator of biosynthesis of siderophores*) codifica um fator de transcrição da família GATA (Urbs1) que regula negativamente a expressão dos genes *sid1* e *sid2*, sendo o gene *urbs1* regulado por ferro. Urbs1 contém dois motivos dedo de zinco característicos dos fatores de transcrição da família GATA (Voisard *et al.*, 1993).

Após o isolamento de *urbs1*, um estudo desenvolvido por Haas *et al.* (1997) permitiu o isolamento e a caracterização do gene *sreP* de *Penicillium chrysogenum* que codifica o fator de transcrição SREP do tipo GATA. Verificou-se que a sequência deduzida de SREP contém dois motivos dedo de zinco e uma sequência entre estes rica em cisteínas, sendo que esta região da proteína mostrou ter 50% de identidade com a respectiva região de Urbs1. Estes pesquisadores utilizaram, como estratégia para o isolamento do gene *sreP*, a síntese de cDNA pelo método RACE desenvolvido por Frohmann *et al.* (1988) e o emprego de dois *primers* degenerados desenhados com base na sequência conservada do domínio de ligação ao DNA da família de proteínas GATA.

Em estudos subsequentes esta abordagem permitiu o isolamento e a caracterização de genes que codificam fatores de transcrição GATA envolvidos na regulação da biossíntese de sideróforos em diferentes espécies de fungos. Em *Neurospora crassa* foi identificado o gene *sre* (Zhou *et al.*, 1998; Zhou & Marzluf, 1999; Harrison & Marzluf, 2002) e em *Aspergillus nidulans* o gene *sreA* (Haas *et al.*, 1999), sendo que as proteínas codificadas por estes genes são homólogas à Urbs1 e à SreP (Harrison & Marzluf, 2002).

Desta forma, com o objetivo de se isolar genes que codificam fatores GATA envolvidos na biossíntese de sideróforos nas espécies de fungos *Phanerochaete chrysosporium* e *Lentinula edodes* a estratégia utilizada nos estudos acima citados foi utilizada neste trabalho.

2. Materiais e métodos

Para se buscar o isolamento de genes envolvidos na regulação da síntese de sideróforos, foram realizadas reações de amplificação utilizando *primers* degenerados desenhados a partir de domínios conservados nas proteínas GATA. Para tanto, duas abordagens foram utilizadas. Na primeira, DNA genômico dos fungos estudados foi usado em reações de amplificação com os *primers* degenerados. Esta abordagem foi utilizada como uma alternativa para se tentar garantir o isolamento do gene sendo que posteriormente poderia se obter a sequência do transcrito. Na segunda abordagem foram sintetizadas fitas simples de cDNA método RACE as quais foram utilizadas como molde em duas reações de amplificação seguidas, sendo que na primeira reação foi usado um *primer* degenerado e um *primer* adaptador, para o enriquecimento dos cDNAs e na segunda reação (*nested*) foi empregado outro *primer* degenerado para a amplificação dos transcritos específicos.

2.1 Condições de crescimento

As linhagens BKM 1767 de *P. chrysosporium* e UEC 2019 de *L. edodes*, cedidas pelo Prof. Dr. André Ferraz, da Faculdade de Engenharia Química de Lorena (FAENQUIL) foram utilizadas.

O micélio foi crescido em meio líquido de extrato de malte 2% sob agitação por 10 dias a 28°C em duas situações diferenciais: a) com disponibilidade de ferro(III) no meio (90 µM de FeCl₃) visando a repressão da produção de sideróforos e, b) sem ferro(III) ou com concentração de ferro(III) muito reduzida para indução da produção de sideróforos. Os micélios obtidos foram filtrados e estocados em freezer – 80°C para posterior utilização.

2.2 Amplificações utilizando DNA genômico

Como mencionado anteriormente, DNA genômico de *P. chrysosporium* e de *L. edodes* foram usados como molde nas reações de amplificação. Para tanto, procedeu-se inicialmente a padronização da extração de DNA.

2.2.1 Extração de DNA

Para a padronização da extração do DNA genômico foram testadas as seguintes

metodologias:

a) Método de Zhang *et al.* (1996)

Em um almofariz cerca de 100 mg de micélio foi pulverizado em presença de nitrogênio líquido e deixado a – 20°C durante a noite. Após este período, foi acrescentado 0,75 mL do tampão de lise (100 mM Tris-HCl pH 7,5; 50 mM EDTA; 2% SDS e 1% 2-mercaptoetanol). À suspensão foram acrescentados 0,15 mL de NaCl 5 M e 0,1 mL da solução composta de 10% CTAB e 0,7 M NaCl. Incubou-se o material por 45 min a 65°C, invertendo-se ocasionalmente e, em seguida, por 15 min a 37°C. Adicionou-se 1,0 mL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v). Após centrifugação, a fase superior foi transferida para novo tubo e misturada a 0,55 volumes de isopropanol, centrifugou-se, e o *pellet* obtido foi lavado com etanol 70%, secado, ressuscitado em 1,0 mL de água deionizada e incubado a 37°C por 30 min com 0,1 mg de RNase A. O DNA foi extraído com 1,0 mL de fenol, e em seguida com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v). Em seguida, foi precipitado com 0,8 mL de isopropanol, centrifugado e lavado com 0,7 mL de etanol 70%. O *pellet* obtido foi secado e ressuscitado em 100 µL de TE.

b) Método de Wang *et al.* (1993)

Em um almofariz cerca de 100 mg de micélio foi pulverizado em presença de nitrogênio líquido. Acrescentou-se 0,7 mL de tampão de extração constituído de: 2% CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 1% PVP e 0,2% 2-mercaptoetanol e incubou-se a 65°C por 60 min, agitando-se o tubo a cada 10 min. Após a amostra voltar à temperatura ambiente, foi acrescentado 0,6 mL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v) agitando-se os tubos por 5 min. Após centrifugação, a fase superior recuperada foi misturada a 10% CTAB e 1,4 M NaCl (1/10 do volume), por 5 min. Realizou-se nova extração com clorofórmio:álcool isoamílico. À fase superior recuperada foi adicionado isopropanol (2/3 do volume) e a mistura foi mantida a – 20°C durante a noite. O material foi centrifugado e o *pellet* obtido foi lavado 2 vezes com etanol 70%, seguido de uma lavagem com etanol absoluto. O *pellet* foi então secado e ressuscitado em 100 µL de TE com 10 µg/mL de RNase A incubando-se por 120 min a 37°C.

c) Extração com o Dneasy Plant Mini Kit (QIAGEN)

Para a obtenção de DNA foram seguidos os passos descritos no protocolo de extração fornecido pelo fabricante. Cada amostra (cerca de 100 mg) foi macerada na presença de nitrogênio líquido.

Os DNAs obtidos nas extrações utilizando os protocolos descritos acima foram corridos em gel de agarose 0,8%, TBE 1X (1X TBE = 0,09 M Trizma; 0,09 M Ácido Bórico; 20 mM EDTA pH 8,0) para verificar a eficiência da extração e a qualidade do DNA extraído.

2.2.2 PCR com *primers* degenerados

A reação de amplificação foi constituída de dois *primers* degenerados, os quais incluem a região conservada dos domínios dedo de zinco dos fatores GATA, sendo os *primers* denominados Urbs1-1 (5'-ACNCCNYTNTGGMG-3') descrito por Haas *et al.* (1997) e Urbs1-3 (5'-ARNCCRCANGCRTTRCA-3') descrito por Zhou *et al.* (1998), onde Y= T ou C; M= A ou C; R= A ou G; N= A, T, G ou C. A mistura de reação foi constituída de 1-5 ng de DNA de *P. chrysosporium* ou *L. edodes*; 2 µL de cada *primer* degenerado (20 pmol/µL); 2,5 µL da mistura de dNTPs a 2 mM; 5 µL de tampão de amplificação 10X (100 mM Tris-HCl pH 9,0; 15 mM MgCl₂; 500 mM KCl); 2,5 U de *Taq* DNA Polimerase (Amersham Biosciences) e água deionizada para um volume final de 50 µL. Os ciclos de amplificação utilizados foram: 1 ciclo de 94°C (5 min) seguido de 33 ciclos de 94°C (1 min), 40°C (1 min) e 72°C (1 min) e um ciclo final de 72°C (10 min).

Cabe ressaltar que foram testados ajustes na temperatura de anelamento (40°C, 42°C e 45°C) e da concentração de MgCl₂ (0,8 mM; 1,0 mM; 1,5 mM; 2,0 mM) nas diferentes temperaturas.

2.3 Amplificações utilizando cDNA como molde

A segunda estratégia empregada neste estudo foi o uso de cDNAs sintetizados pelo método 3' RACE (InvitrogenTM) nas reações de amplificação juntamente como a utilização do *primer* degenerado Urbs1-1 (2.2.2, deste capítulo) na primeira reação de amplificação e do *primer* Urbs1-2 (5'-TGAAAYGCNTGYGGNYT-3') descrito por Haas *et al.* (1997) onde Y= T ou C; M= A ou C; R= A ou G; N= A, T, G ou C, na reação de amplificação *nested*.

2.3.1 Extração de RNA

Com objetivo de obter RNA total integro para a realização dos experimentos, inicialmente foram testadas três metodologias (a até c) e posteriormente foi obtido um quarto protocolo (d), descritos a seguir:

a) Método de Logemann *et al.* (1987)

Nesta metodologia 400 mg de micélio, foi macerado em almofariz na presença de nitrogênio líquido, até se obter um pó fino. Este foi homogeneizado em 1,0 mL de solução contendo 8 M Guanidina-HCl, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 20 mM EDTA pH 8,0 e 50 mM 2-mercaptoetanol. Em seguida, foi realizada uma extração com fenol (pH 7,0):clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1, v/v/v) seguida de uma extração com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v). O RNA total foi precipitado através da adição de 0,2 volumes de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e um volume de etanol absoluto gelado. Após centrifugação, o precipitado de RNA foi lavado com etanol 70%, ressuscitado em 50 µL água estéril tratada com DEPC e estocado em freezer à - 80°C.

b) Extração com TRIzol™ (Invitrogen™)

O micélio foi macerado na presença de nitrogênio líquido até se transformar em um pó fino. Acrescentou-se 1,0 mL de TRIzol para cada 100 mg de tecido e a mistura foi incubada por 5 min à temperatura ambiente. Após este período, acrescentou-se 0,2 mL de clorofórmio por mL de TRIzol utilizado, homogeneizando vigorosamente, e incubou-se novamente, desta vez por 3 min, à temperatura ambiente. Em seguida, o material foi centrifugado e a fase aquosa recuperada foi incubada por 10 min à temperatura ambiente com 0,5 mL de isopropanol para cada mL de TRIzol utilizado inicialmente. Após este período o material foi centrifugado e o *pellet* obtido foi lavado com etanol 70%, centrifugado, secado à temperatura ambiente, ressuscitado em 50 µL de água estéril tratada com DEPC e estocado em freezer a - 80°C.

c) Método de Windericks & Castro (1994)

Nesta metodologia 400 mg de micélio, foi macerado em almofariz na presença de nitrogênio líquido, até se obter um pó fino que foi homogeneizado em 1,0 mL de solução

contendo 0,1 M cloreto de lítio; 0,1 M Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0, 10 mM acetato de sódio e 10 mM acetato de iodo. Em seguida, foi realizada uma extração com fenol (equilibrado com água):clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1, v/v/v) contendo 1% SDS e em seguida uma extração com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v). O RNA total foi precipitado através da adição de 1/20 volumes de acetato de potássio 40% pH 5,5 e dois volumes de etanol absoluto gelado. Após centrifugação, o precipitado de RNA foi lavado com etanol 70%, ressuspensionado em água estéril tratada com DEPC e estocado em freezer a - 80°C.

d) Método de Sokolovsky *et al.* (1995)

O micélio (20-300 mg) foi macerado na presença de nitrogênio líquido, até se obter um pulverizado homogêneo, ao qual foi acrescentada a solução contendo 0,75 mL de tampão de lise (0,6 M NaCl, 10 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8,0 e 4,0% SDS) e 0,75 mL de fenol (pH 7,5-7,8). Agitou-se a amostra por 15-20 min e centrifugou-se 10 min, a 10.000 rpm. Procedeu-se uma nova extração com fenol e à fase aquosa superior recuperada, acrescentou-se 0,75 volumes de LiCl 8 M, sendo que o material foi deixado a 4°C durante a noite. Após este período, o material foi brevemente misturado em vortex e centrifugado. O *pellet* obtido foi ressuspensionado em 0,3 mL de água bidestilada, misturado com 0,03 mL de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 0,75 mL de etanol absoluto, e, mantido por 2 h a -20°C. Em seguida, o material foi centrifugado e o *pellet* obtido foi lavado com etanol 70%, secado, ressuspensionado em 100-400 µL de água DEPC e estocado a - 80°C.

A integridade do RNA total obtido nos diferentes métodos foi verificada em gel de agarose 1% em condições desnaturantes corrido com tampão MOPS 1X pH 7,0 (1X MOPS = 20 mM MOPS; 50 mM Acetato de sódio; 10 mM EDTA pH 8,0) e formaldeído 1,8%.

2.3.2 Síntese de cDNA utilizando o sistema 3' RACE (Invitrogen™)

Para a síntese da primeira fita de cDNA foi utilizado o sistema 3' RACE *System for Rapid Amplification of cDNA Ends* (Invitrogen™). Cerca de 1-5 µg de RNA total foram utilizados em um volume total de 11 µL. Após a adição 1 µL do *primer* adaptador AP (5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3', 10 µM) a mistura foi aquecida por 10 min a 70°C e após mantida em gelo por no mínimo um minuto. Em seguida foi

acrescida da mistura de amplificação constituída de: 2 µL de tampão de PCR 10X; 2 µL de MgCl₂ 25 mM, 1 µL da mistura de dNTPs a 10 mM e 2 µL de DTT 0,1 M. Após leve agitação, a mistura foi incubada a 42°C por 2 a 5 min. Adicionou-se 200 U de transcriptase reversa SuperScript II RNase H⁻ (InvitrogenTM) e incubou-se em banho a 42°C por 50 min. A reação foi terminada incubando-se a mistura a 70°C por 15 min. Após este período, foi adicionado 1 µL de RNase H e a mistura foi incubada por 20 min a 37°C. O cDNA obtido foi estocado a -20°C. Foram obtidos nesta etapa cDNAs a partir do RNA total de *P. chrysosporium* e *L. edodes* de micélios crescidos sem e com disponibilidade de ferro(III) no meio de cultivo. Uma representação esquemática do procedimento descrito acima está apresentada na Figura 1.

2.3.3 PCR com *primers* degenerados

Para a amplificação dos transcritos foram utilizados os *primers* Urbs1-1 (degenerado) e AUAP (5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3') 10 µM sendo o último fornecido no sistema 3' RACE. A reação foi constituída por 2 µL do cDNA; 5 µL de tampão de amplificação 10X; 2 µL da mistura de dNTPs 5 mM; 1,5 µL MgCl₂ 50 mM; 2 µL do *primer* degenerado (10 µM); 2 µL do *primer* AUAP (10 µM) e 2,5 U de *Taq* DNA Polimerase (Amersham Biosciences). O volume da mistura de reação final foi ajustado para 50 µL. Os ciclos de amplificação foram: desnaturação a 94°C (2 min), seguida de 40 ciclos de 94°C (1 min), 62°C (2 min) e 72°C (2 min), com extensão final de 62°C (2 min) e 72°C (7 min).

2.3.4 PCR *nested*

Como mostrado na representação esquemática abaixo (Figura 1), os cDNAs enriquecidos obtidos a partir da primeira PCR foram utilizados como molde em uma segunda reação de amplificação utilizando o *primer* degenerado *nested* Urbs1-2 e o *primer* AUAP. A reação foi constituída por 1,5-3 µL do produto da primeira PCR; 5 µL de tampão de amplificação 10X; 2 µL da mistura de dNTPs 5 mM; 1,5 µL MgCl₂ 50 mM; 2 µL do *primer* degenerado 10 µM; 2 µL do *primer* AUAP 10 µM e 2,5 U de *Taq* DNA Polimerase (Amersham Biosciences). O volume final foi ajustado para 50 µL. As condições de amplificação foram: desnaturação a 94°C (2 min), seguida de 40 ciclos de 94°C (1 min), 62°C (2 min) e 72°C (2 min), com extensão final de 62°C (2 min) e 72°C (7 min).

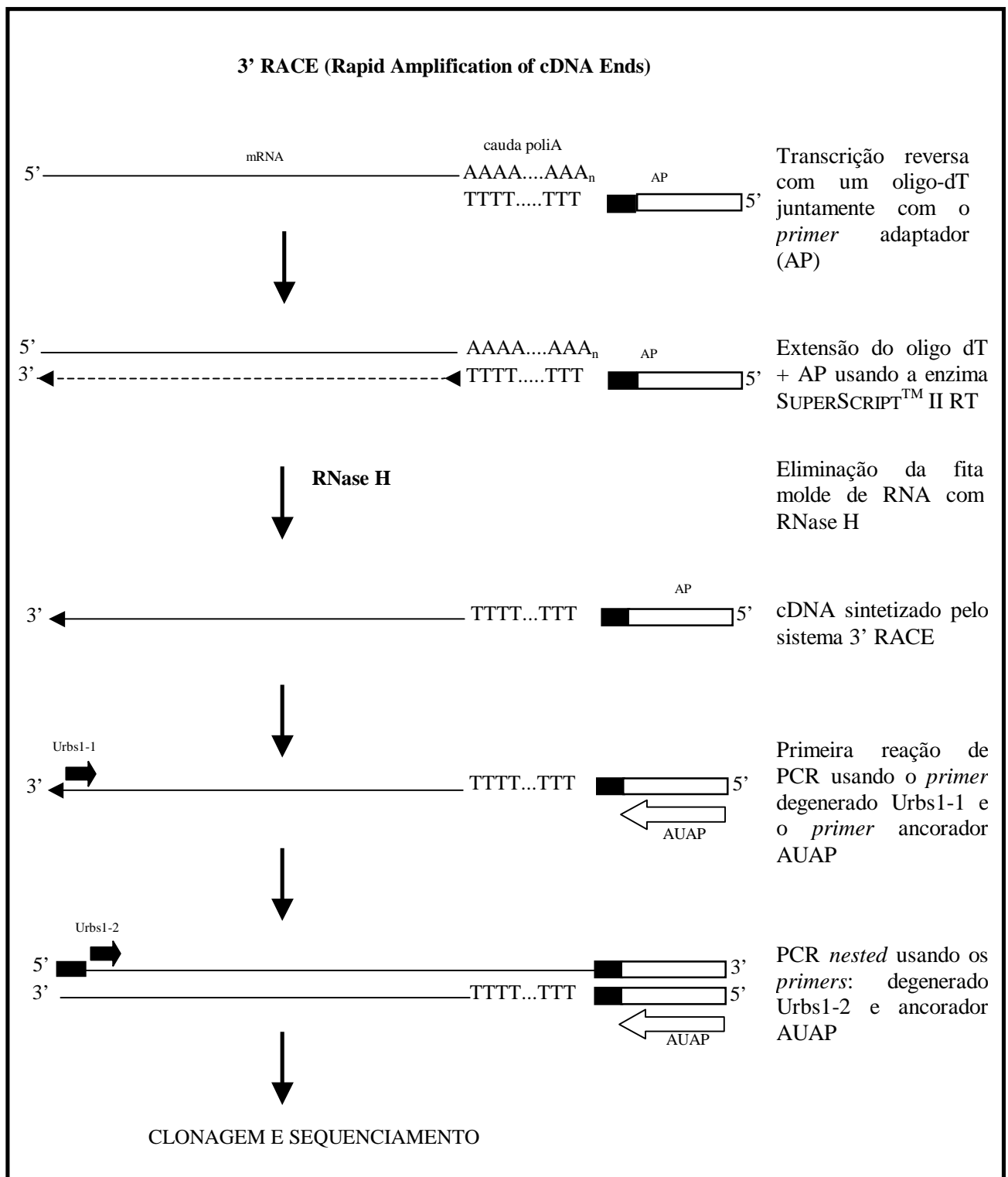


Figura 1. Esquema da síntese de cDNA pelo sistema 3' RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*, Invitrogen™). *Primers*: Urbs1-1, Urbs1-2, AP (*Adapter Primer*) e AUAP (*Abridged Universal Amplification Primer*). Retirado do *User Manual* (Invitrogen™).

2.3.5 Clonagem

Os fragmentos obtidos na PCR *nested* foram clonados utilizando-se o pGEM®-T *Easy Vector System* (Promega). A reação de ligação foi constituída da mistura de: 1 µL do tampão 10X da T4 DNA ligase (300 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM MgCl₂, 100 mM DDT e 10 mM ATP), 1 µL do vetor (50 ng), 1 µL da T4 DNA ligase (3 U/µL), 4-7 µL do fragmento amplificado (150 ng) e água (se necessário) para um volume final de 10 µL. Esta mistura foi incubada a 4°C durante a noite.

Para a transformação adicionou-se 5 µL da mistura de ligação a 100 µL de células competentes DH5α, permanecendo por 20-30 min em banho de gelo. Após este período, foi dado um choque térmico a 42°C por 50 s, incubou-se 3 min em gelo e em seguida adicionou-se 0,9 mL de meio LB. O material foi mantido sob agitação a 37°C por 1 h. Por fim, uma alíquota de 300 µL da transformação foi espalhada em placas contendo meio LB-ágar com ampicilina (50µg/mL) e X-Gal (20mg/mL), sendo este procedimento seguido de incubação em estufa a 37°C durante a noite.

2.3.6 Mini-preparação dos plasmídios

As colônias “recombinantes” obtidas foram inoculadas em 5,0 mL de LB líquido contendo ampicilina (50 µg/mL) e crescidas durante a noite a 37°C, sob agitação. Cerca de 2 mL do inóculo foi transferido para tubo de microcentrífuga e centrifugado por 30 a 60 s a 14.000 rpm, sendo este procedimento repetido. O *pellet* de bactérias obtido foi ressuspensionado em 300 µL de uma solução contendo 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0 e RNase A 100 µg/mL. Em seguida, foi adicionado 300 µL da solução contendo 200 mM NaOH e 1% SDS, misturada por leve inversão, seguida de incubação à temperatura ambiente por 5 min. Após este período foi adicionado 300 µL de acetato de potássio 3 M pH 5,5, invertido e foi feita uma centrifugação à 14.000 rpm por 10 min. Coletou-se o sobrenadante ao qual foi adicionado 400 µL de isopropanol gelado procedendo-se nova centrifugação em iguais condições. O *pellet* obtido foi lavado com álcool a 70% e secado à vácuo. O DNA resultante foi ressuspensionado em 40-100 µL de TE 1X e estocado a – 20°C.

Os plasmídios obtidos foram digeridos com a enzima *EcoR* I para confirmar a ligação do fragmento do tamanho esperado. A reação de digestão foi constituída da mistura de: 5 µL

do plasmídio, 5-10 U da enzima, tampão da enzima 1X (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM MgCl₂ e 100 mM NaCl) e água deionizada para um volume final de 30 µL. A reação foi realizada incubando-se a mistura a 37°C por 4 h e o resultado foi verificado em gel de agarose 1%, TBE 1X, 80 V.

2.3.7 Sequenciamento

Para a reação de sequenciamento foram seguidos os passos descritos no protocolo fornecido com o sistema utilizado: “Thermo Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing Kit” (Amersham Biosciences).

O *primer* utilizado nas reações de sequenciamento foi o –40 M13 *forward* 23mer (5'-GTTTCCAGTCACGACGTTGTA-3'), o qual permite o sequenciamento direto do fragmento clonado no vetor pGEM®-T *Easy* (Promega).

As amostras foram corridas em gel de poliacrilamida 6,5%, a 2000 V, 50 mA e 50 W. Após decorrido o tempo de migração, o gel foi transferido para uma folha de papel Whatman 3MM e colocado em um secador de vácuo (Hoefer® Drygel Sr.) a 80°C, por uma hora. Em seguida foi exposto a um filme de raio-X (Kodak X-OMAT AR ou Hyperfilm™ MP, Amersham Biosciences).

As seqüências obtidas foram alinhadas com seqüências contidas no GenBank usando o algoritmo BLAST versão 2.2.1 (Altschul *et al.*, 1997), sendo usada a função BLASTX.

2.3.8 Northern blotting

Para a confirmação da expressão diferencial dos transcritos isolados foram obtidas membranas de *nylon* contendo RNA total de *P. chrysosporium* extraído de micélio crescido com ou sem disponibilidade de ferro utilizando-se o protocolo descrito por Sokolovsky *et al.* (1995). Também, foram feitas membranas contendo RNA total de *L. edodes* para as condições diferenciais de crescimento com ferro.

Para tanto, cerca de 3-6 µg de RNA total foi corrido em gel de agarose 1% com formaldeído 1,8% e MOPS 1X pH 7,0, juntamente com o marcador de peso molecular de RNA de 0,16-1,77 Kb (Invitrogen™) para se estimar o tamanho dos transcritos obtidos. Em seguida, o gel foi lavado com água estéril tratada com DEPC por 15 min, e colocado sob um

aparato de transferência, contendo tampão 2X SSC (1X SSC = 0,15 M NaCl, 15 mM de citrato de sódio). Sobre o gel, colocou-se a membrana de *nylon* Hybond-N⁺ (Amersham Biosciences), duas folhas de papel Whatman 3MM e grande quantidade de papel absorvente. A transferência foi realizada durante a noite. Na manhã seguinte, a membrana foi lavada com 2X SSC durante 15 min sob agitação, e secada a 80°C durante 2 h.

2.3.9 Hibridização

Para a hibridização, as membranas foram incubadas por 2-4 h a 42°C com a solução de pré-hibridização contendo: 50% formamida; 5X SSC; 5X solução de Denhardt's (1X Denhardt's = 0,02% PVP, 0,02% Ficoll 400, 0,02% BSA); 50 mM fosfato de sódio pH 6,8; 1% SDS e 100 µg/mL de DNA de esperma de salmão. Após este período a solução inicial foi retirada e substituída pela solução de hibridização constituída de: 50% formamida; 5X SSC; 20 mM fosfato de sódio pH 7,2; 1% SDS; 5% de sulfato de dextran, e a sonda marcada radiativamente. A hibridização foi realizada durante a noite a 42°C em rotação a 40 rpm.

Após decorrido o período de hibridização, a membrana hibridizada foi lavada duas vezes, sendo a primeira lavagem realizada à temperatura ambiente por 15 min com uma solução de 2X SSC e 0,5% de SDS, e a segunda a 50-55°C por até 15 min com uma solução de 0,1X SSC e 0,5% de SDS. Após as lavagens a membrana foi exposta a um filme de raio-X (Kodak X-OMAT AR ou HyperfilmTM MP, Amersham Biosciences) com intensificador de sinal (Intensifying Screen, Dupont Cronex) a – 80°C.

As membranas foram hibridizadas com sondas controle para normalização da quantidade de RNA plotada. Para as membranas contendo RNA total de *L. edodes* foi utilizado um fragmento de 800 pb do gene que codifica a subunidade 26S de milho, uma vez que seqüências de genes expressos constitutivamente neste fungo não foram encontradas na literatura. Para as membranas contendo RNA total de *P. chrysosporium* foi utilizado como controle um fragmento de cerca de 900 pb do gene constitutivo *gpd* (glyceraldehyde-3-phosphate desidrogenase) de *P. chrysosporium* (Harmsen *et al.*, 1992).

Os sinais de hibridização foram quantificados usando o programa Kodak Digital Science-1D Image Analysis v. 2.0.3 (Eastman Kodak Company, NY, USA), utilizando-se a função *Sum Intensity*. Para normalizar a quantidade de RNA das diferentes amostras de cada

membrana, utilizou-se o sinal obtido na hibridização com a sonda controle (*gpd* ou 26S de milho), de expressão constitutiva. Desta forma, a porcentagem de transcrição dos fragmentos em estudo em cada condição de crescimento (com ou sem ferro) foi calculada dividindo-se o valor da intensidade relativa (*Sum intensity*) de hibridização do fragmento pelo valor relativo obtido na hibridização com a sonda controle na respectiva condição de crescimento.

Os transcritos obtidos nas reações de amplificação utilizando *primers* degenerados e que mostraram homologia com genes de interesse foram utilizados como sondas na hidridização. Para tanto os fragmentos foram purificados de gel, após a reação de digestão dos plasmídios com a enzima de restrição *EcoR* I (InvitrogenTM), utilizando-se o sistema “In ConcertTM Rapid Gel Extraction” (InvitrogenTM).

Os fragmentos usados como sonda foram marcados utilizando-se o sistema “RadPrime DNA Labeling” (InvitrogenTM) juntamente com [α -³²P]dCTP (Amersham Biosciences), seguindo os procedimentos fornecidos pelo fabricante.

3. Resultados e discussão

3.1 Isolamento de genes utilizando DNA como molde

3.1.1 Extração de DNA

Para a extração de DNA genômico de *P. chrysosporium* e *L. edodes* a técnica descrita por Wang *et al.* (1993), permitiu a extração de DNA de boa qualidade (Figura 2) para a utilização nos procedimentos realizados nesta etapa do trabalho. Utilizando as outras duas metodologias testadas obteve-se um DNA de baixa qualidade, mostrando degradação (dados não mostrados).

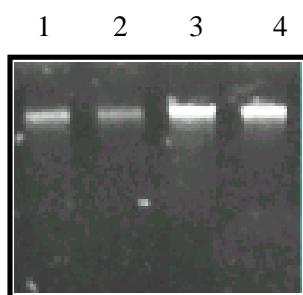


Figura 2. DNA genômico de *P. chrysosporium* e de *L. edodes* obtidos utilizando-se a metodologia descrita por Wang *et al.* (1993). Amostras: **1 e 2.** *P. chrysosporium* (2,1381 µg/µL e 1,1569 µg/µL); **3 e 4.** *L. edodes* (3,068 µg/µL e 4,6970 µg/µL).

3.1.2 PCRs com *primers* degenerados utilizando DNA como molde

Após a padronização da extração de DNA, foram realizadas reações de amplificação utilizando os *primers* Urbs1-1 e Urbs1-3. Como resultado, observou-se a amplificação de fragmentos de diversos tamanhos, independentemente das condições testadas (Figura 3). Com os resultados obtidos neste experimento optou-se por concentrar os experimentos na utilização de cDNA como molde para se tentar isolar genes de *P. chrysosporium* e *L. edodes* que codificam fatores de transcrição GATA.

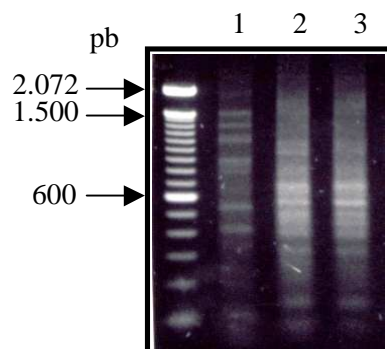


Figura 3. Foto com gel de produto de reação de amplificação utilizando DNA genômico e *primers* degenerados. Amostras: **1.** *P. chrysosporium*, **2 e 3.** *L. edodes*. Marcador de peso molecular 100 pb (InvitrogenTM).

3.2 Isolamento de genes utilizando cDNA como molde

3.2.1 Extração de RNA total

Com o objetivo de estabelecer uma metodologia eficiente e obter um RNA integro inicialmente foram testadas três metodologias de extração de RNA total (2.3.1, neste capítulo). Os melhores resultados foram obtidos com o protocolo descrito por Logemann *et al.* (1987), sendo que para as outras duas metodologias testadas o RNA foi obtido em quantidade muito baixa no caso da técnica descrita por Windericks & Castro (1994), ou não foi obtido no caso da técnica que utiliza TRIzol. Posteriormente, foi obtido um quarto protocolo de extração de RNA total, desenvolvido por Sokolovsky *et al.* (1995), o qual permitiu uma eficiência na extração do RNA total muito superior aos protocolos anteriormente testados (Figura 4). Ainda, como vantagem este protocolo permite a manipulação da amostra à temperatura ambiente.

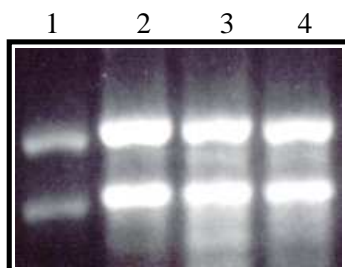


Figura 4. Foto de gel de agarose 1% com amostras de RNA total extraídas com o protocolo de Sokolovsky *et al.* (1995): **1 e 2.** *P. chrysosporium* crescido em meio sem e com ferro(III), respectivamente; e **3 e 4.** *L. edodes* crescido em meio sem e com suprimento de ferro(III), respectivamente.

3.2.2 Reações de amplificação

Com a padronização do protocolo de extração de RNA (Sokolovsky *et al.*, 1995), foram sintetizados cDNAs para cada condição de crescimento do micélio dos fungos estudados. Para a síntese destes cDNAs foi utilizado o sistema 3' RACE (InvitrogenTM).

Para a amplificação dos transcritos inicialmente foi feita uma PCR utilizando o *primer* degenerado Urbs1-1 e o *primer* AUAP. Em seguida, o cDNA enriquecido obtido na primeira amplificação foi utilizado em uma PCR *nested* juntamente com os *primers* AUAP e Urbs1-2 (degenerado). Os resultados obtidos na primeira PCR e na PCR *nested* estão mostrados na Figura 5.

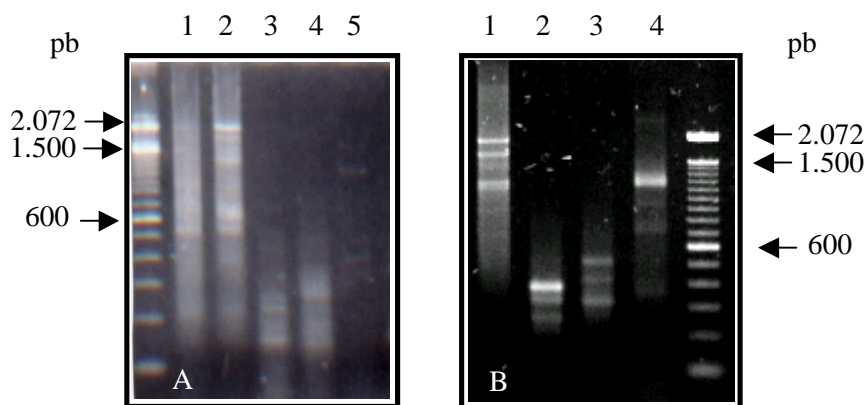


Figura 5. Resultado das PCRs usado cDNAs 3'RACE e os *primers* degenerados Urbs1-1 e Urbs1-2 **A.** Primeira reação de amplificação das amostras com Urbs1-1: 1 e 2. *P. chrysosporium* crescido em meio sem ferro, 3. *P. chrysosporium* crescido com ferro, 4. *L. edodes* crescido sem ferro, 5. *L. edodes* crescido com ferro; e, **B.** PCR *nested* das amostras com Urbs1-2: 1. *P. chrysosporium* crescido sem ferro, 2. *P. chrysosporium* crescido com ferro, 3. *L. edodes* crescido sem ferro, 4. *L. edodes* crescido com ferro. Marcador de peso molecular 100 pb (InvitrogenTM).

3.2.2 Clonagem, sequenciamento e alinhamento no GenBank

Após a amplificação de diferentes fragmentos de cDNA (Figura 5), procedeu-se a clonagem destes utilizando o produto final da PCR *nested* na reação de ligação com o vetor. Desta maneira, foram obtidos fragmentos tamanho variando de entre 300 pb e 2.000 pb para *P. chrysosporium* crescido em meio sem suprimento de ferro(III); e, com 200 pb e 300 pb para micélio crescido com suprimento de ferro(III). Já para *L. edodes* foram obtidos fragmentos de

350 pb a 700 pb e de cerca de 250 pb a 1.400 pb quando o micélio foi crescido em meio sem e com suprimento de ferro(III), respectivamente.

Após o sequenciamento de diferentes transcritos isolados para *P. chrysosporium* e *L. edodes* em cada condição de cultivo, as seqüências obtidas foram alinhadas com seqüências contidas no GenBank. Os resultados dos alinhamentos das seqüências obtidas no GenBank estão apresentados na Tabela 1 (*P. chrysosporium*) e na Tabela 2 (*L. edodes*), e as seqüências obtidas para estes fragmentos estão apresentadas no Anexo I.

Cabe ressaltar que devido ao número grande de clones obtidos nesta etapa do estudo as seqüências dos fragmentos foram obtidas utilizando-se o *primer sense*, homólogo ao vetor (– 40 M13 *foward* 23mer) que permitia a obtenção de fragmentos de cerca de 250-350 pb, tamanho este suficiente para se proceder uma triagem inicial das homologias observadas para os fragmentos clonados com seqüências depositadas em bancos de dados. Desta forma, obteve-se a seqüência nucleotídica do fragmento 2.3, cuja seqüência deduzida de aminoácidos mostrou similaridade com proteínas envolvidas na biossíntese de sideróforos. Como, entre os objetivos deste estudo estava o isolamento de genes regulados por ferro envolvidos na biossíntese de sideróforos optou-se por direcionar os experimentos para tentar isolar o transcrito completo respectivo ao fragmento 2.3. Diversas outras seqüências mostraram homologias interessantes e ainda podem e devem ser objetivo de próximos estudos.

Tabela 1. Resultados obtidos para o alinhamento das seqüências dos transcritos obtidos a partir de micélio de *P. chrysosporium*, crescido em meio com carência (clones 1.x) e meio com suprimento (clones 2.x) de Fe(III).

Fragmento	Meio de cultivo ^a	Tamanho (pb) ^b	Homologias (Número de acesso no GenBank)	Frame	Identidade (%)	Similaridade (%)	Escore, E-value
1.1	C	340	Proteína hipotética <i>Dictyostelium discoideum</i> (AAM44308)	-2	32	50	32, 2,9
1.2, 1.3 e 1.7	C	1.110 1.700 1.000	ZnT2 transportador de zinco tipo-ZIP <i>Thlaspi caerulescens</i> (AF275752_1)	+3	35	44	37, 0,06
1.8	C	1.110	Regulador da transcrição da família <i>lysR</i> <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 (NP_644079)	-3	35	48	32, 2,1
1.11	C	1.500-2.072	Receptor TonB-dependente <i>Caulobacter crescentus</i> CB15	-1	51	65	30, 13,0
1.15	C	1.100	Proteína da família de Acetiltransferases <i>Caenorhabditis elegans</i> (NP_495953)	-3	39	63	33, 1,4
2.3	S	204	Alquilbenzeno dioxigenase, subunidade ferredoxina EbdAC <i>Pseudomonas putida</i> (CAB99198)	+2	36	57	29, 15,0
			Fator de transcrição GATA <i>Botryotinia fucke</i> (CAC36427)	+3	50	57	28, 21,0
			Repressor da biossíntese de sideróforos SREA <i>Aspergillus nidulans</i> (AFO95898)	+3	54	66	27, 27,0
			Fator GATA SREP <i>Penicillium chrysogenum</i> (AAC49628)	+3	54	66	27, 27,0
			Proteína de regulação da biossíntese de sideróforos SRE <i>Neurospora crassa</i> (AAC64946)	+3	48	68	27, 36,0
2.46	S	300	Proteína hipotética <i>Plasmodium falciparum</i> 3D7 (NP_700928)	-2	25	46	32, 1,6

^a C= meio com carência de ferro(III) e S= meio com suprimento de ferro(III);

^b Tamanho do fragmento estimado com base no marcador de peso molecular de 100 pb (InvitrogenTM).

Tabela 2. Resultados obtidos para o alinhamento das seqüências dos transcritos obtidos a partir de micélio de *L. edodes* crescido em meio com

carência (clones 3.x) e meio com suprimento (clones 4.x) de Fe(III).

Fragmento	Meio de cultivo ^a	Tamanho (pb) ^b	Homologias (Número de acesso no GenBank)	Frame	Identidade (%)	Similaridade (%)	Escore, <i>E-value</i>
3.28	C	350	Similar a Fre1p e Fre2p <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (NP_012702)	-1	28	40	32, 2,3
3.48	C	550	Ativador da transcrição da D-serina desidratase <i>E. coli</i> (GGECDW)	-3	39	60	32, 2,4
4.1	S	1.300	SAP2 (fosfatase ácida 2) <i>Leishmania mexicana</i> (CAA87091)	-1	25	23	32, 2,2
4.4,	S	800	Aspartil-tRNA sintetase, Msd1p <i>S. cerevisiae</i> (NP_015221)	-3	51	55	41, 2e-04
4.18,		950		-3	50	56	42, 5e-04
4.40 e		850		-3	46	53	42, 2e-04
4.45		750		-2	50	56	42, 0,003
4.8,	S	1.100	Produto do gene CG5228 <i>Plasmodium yoelii yoelii</i> (EAA19160)	-1	45	57	39, 0,013
4.10 e		1.100		-2	30	56	46, 1e-04
4.30		1.150		-1	45	56	40, 0,006
4.14 e	S	1.200 e	Glicoproteína gp2 <i>Equine herpesvirus</i> (AAK61480)	-3	24	34	35, 0,25
4.34		1.350		-1	26	36	39, 0,024
4.19	S	1.250	Provável regulador transcricional <i>Pseudomonas aeruginosa</i> str. PAO1 (NP_250113)	-1	52	78	30, 8,4
4.33 e	S	1.300 e	Glicerato quinase <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 (CAD65399)	-1	52	76	30, 6,5
4.59		1.250		-2			
4.38	S	260	Proteína da capa Cucumbers mosaic virus (AAN40994)	-3	95	95	40, 0,006
4.41	S	600	Provável proteína de membrana <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (NP_215190)	-1	27	48	30, 6,1
4.43	S	470	Cadeia glutamina da carbamoil-fosfatase sintetase <i>Pasteurella multocida</i> (NP_246441)	-2	29	45	31, 3,6
4.53	S	700	Celobiohidrolase <i>Trametes (Coriolus) versicolor</i> (AF233583_1)	-3	34	46	38, 0,026
4.54	S	600	Provável proteína de ligação à ATP/GTP <i>Ureaplasma urealyticum</i> (NP_078100)	+2	34	52	30, 5,5

^a C= meio com carência de ferro(III) e S= meio com suprimento de ferro(III);

^b Tamanho do fragmento estimado com base no marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen™).

3.2.4 Confirmação da expressão diferencial dos transcritos isolados por meio de RACE

Para confirmar a expressão regulada por ferro dos transcritos isolados neste experimento foi usada a metodologia de *Northern blotting*. Desta forma, a expressão diferencial regulada pela carência de ferro foi confirmada para os fragmentos de cDNA 1.3 (1.1 e 1.2), 1.8, 1.11 e 1.15 de *P. chrysosporium* (Tabela 1). Para *P. chrysosporium* crescido em condições de suprimento de ferro(III) a expressão diferencial foi confirmada para o transcrito 2.3, enquanto que para o transcrito 2.46 não foi confirmada a expressão regulada por ferro, uma vez que não se observou hibridização do mesmo com o RNA total fixado na membrana, independentemente da condição de crescimento do micélio (resultado não mostrado).

Para os fragmentos isolados de *L. edodes* verificou-se que a expressão dos transcritos 3.28 e 3.48, obtidos a partir de micélio crescido em condições de carência de ferro(III), foi regulada diferencialmente por ferro, por outro lado, nenhum dos transcritos isolados a partir de micélio crescido com de suprimento de ferro(III) teve sua expressão regulada por este metal confirmada não tendo sido observada hibridização das sondas com nenhum dos RNAs totais (com e sem ferro) plotados na membrana. Uma explicação para que não se tenha observado hibridização para vários transcritos obtidos nesta etapa do trabalho, seria o fato de que muitos transcritos devem ter sido expressos em quantidades muito baixas e desta forma não foram detectados na análise de *Northern blotting*. Outra explicação seria o fato de que os RNAs utilizados para síntese dos cDNAs não foram os mesmos fixados nas membranas de nylon por *Northern blot*, sendo estes extraídos de micélios de cultivos diferentes. Embora estes micélios tenham sido crescidos com as mesmas condições de composição do meio, temperatura e agitação.

Desta forma, como mostrado na Figura 6, os cDNAs clonados em 1.1, 1.3 e 1.8 foram expressos somente em condições de ausência de ferro(III) no meio de cultivo.

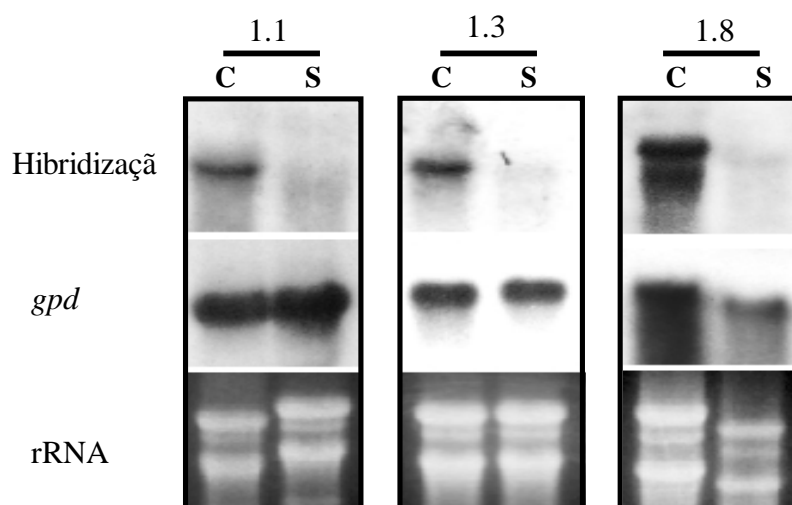


Figura 6. Análise de *Northern blotting* para os fragmentos 1.1, 1.3 e 1.8, isolados de *P. chrysosporium*. Condições de cultivo: C= carência de ferro(III) no meio e S= suprimento de ferro(III) no meio de cultivo. Na figura estão mostrados os resultados da hibridização: do fragmento marcado radiativamente, da sonda *gpd* usada para normalização da quantidade de RNA na membrana; e, gel de agarose 1% com as amostras de RNA total (rRNA).

A sequência de aminoácidos deduzida para o fragmento 1.1, expresso somente na carência de ferro(III), apresentou homologia com uma proteína hipotética de *Dictyostelium discoideum* com 32% de identidade (Tabela 1), sendo que o tamanho do transcrito completo correspondente a 1.1 foi de cerca de 2.150 pb. O tamanho foi estimado a partir da análise de *Northern blotting*, com base no marcador de peso molecular de RNA de 0,16-1,77 Kb (InvitrogenTM) corrido no gel de agarose juntamente com RNA total.

O fragmento 1.3 (1.2 e 1.7), cujo tamanho estimado para o transcrito correspondente é de 1.680 pb, teve sua expressão induzida devido à carência de ferro no cultivo (Figura 6). A sequência de aminoácidos deduzida de 1.3 alinhou com a proteína transportadora de zinco do tipo ZIP, ZNT2, de *Thlaspi caerulescens* apresentando uma identidade de 44%. Em ratos, a proteína de membrana ZnT2 foi isolada, tendo-se verificado que esta possui um papel de facilitar o seqüestro e o acúmulo de zinco em vesículas endossomais (Palmiter *et al.*, 1996). Como o ferro, o zinco é requerido para a manutenção e a atividade de inúmeras metaloproteínas que apresentam um papel estrutural (como proteínas dedo de zinco) e possui ainda uma função catalítica como parte do sítio ativo de várias metaloenzimas (Palmiter *et al.*,

1996). Um mecanismo importante para a regulação dos níveis de zinco na célula é a produção de proteínas transportadoras que facilitam o influxo de zinco durante a deficiência do metal e o efluxo do mesmo quando em excesso. Em leveduras alguns destes transportadores de zinco foram identificados, entre estes o transportador ZRT1 que media a captação de alta-afinidade por zinco e é induzido por carência de zinco, e, o transportador ZRT2 o qual participa da captação de zinco com baixa afinidade (Zhao & Eide, 1996 a, b). Ainda, em leveduras, o envolvimento de vesículas endossomais no transporte de ferro têm sido reportado. Um dos principais sistemas de captação de ferro de alta afinidade deste fungo envolve as proteínas expressas pelos genes *ARN1-ARN4*. Estes transportadores são expressos em vesículas intracelulares que correspondem ao compartimento endossomal e cada transportador *ARN* possui especificidade para cada uma das diferentes classes de sideróforos (Yun *et al.*, 2001; Lessuisse *et al.*, 2001; Philpott *et al.*, 2002; Kosman, 2003).

Desta forma, a homologia obtida para a seqüência de aminoácidos deduzida para os fragmentos 1.2, 1.3 e 1.7 com uma proteína transportadora de zinco a qual pode possuir um papel de facilitar o seqüestro e o acúmulo de metal, no caso o zinco, em vesículas endossomais, sugere que estes transcritos podem codificar uma proteína envolvida no transporte de metal. Como mostrado na Figura 6, foi verificada que a expressão destes transcritos (analisada somente para o fragmento 1.3, como representante) foi induzida pela carência do metal do mesmo modo que o observado em leveduras com a expressão regulada por zinco. Estudos adicionais permitirão elucidar se estes transcritos codificam realmente proteínas transportadoras e o papel destes no processo de captação de ferro em *P. chrysosporium*.

O fragmento 1.8 induzido em condições de carência de ferro no meio de cultivo (Figura 6), teve sua seqüência de aminoácidos deduzida a qual alinhou com uma identidade entre seqüências de 35% com um regulador de transcrição da família LysR de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Segundo revisão em Gerischer (2002), diferentes estratégias são usadas pelas bactérias para degradar recursos de compostos aromáticos, sendo que estes processos são regulados na etapa de expressão dos genes, entre outras. Esta regulação inclui controles específicos em resposta à disponibilidade do substrato e em muitos casos, a um controle global que responde a outras fontes de carbono ou ao *status* metabólico da célula. Entre os reguladores mais comumente encontrados estão os da família LysR. Esta família de

reguladores da transcrição é composta de mais de 50 proteínas (Schell, 1993). Hamood *et al.*, (1996) descreveram o gene *ptxR* que codifica a PtxR um ativador pertencente à família de reguladores transcricionais LysR. Inicialmente a proteína PtxR foi descrita como tendo um papel na regulação da produção de exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*. Estudos posteriores desenvolvidos por Vasil *et al.* (1998) sugeriram que PtxR afeta a expressão de genes da síntese de sideróforos em *P. aeruginosa*. Esta bactéria produz dois sideróforos a pioverdina e a piobactina. A síntese da pioverdina é dependente de um fator sigma, PvdS, requerido para a expressão de uma série de promotores *pvd*. Em um estudo conduzido por Stintzi *et al.* (1999), foi reportada a identificação de um *operon* de quatro genes (*pvcABCD*) requerido para a produção da pioverdina. Dada a proximidade do gene *ptxR* com o *operon pvcABCD*, o papel do mesmo na regulação da produção da pioverdina foi estudado, sendo que a deleção deste gene aboliu a expressão dos genes *pvc*. O gene *ptxR* possui dois sítios independentes de iniciação da transcrição (T1 e T2), sendo que a transcrição a partir do promotor de T1 é constitutiva e a transcrição do segundo promotor (P2) é afetada negativamente por ferro. A expressão do gene *ptxR* é regulada por ferro em dois níveis. Em condições microaeróbicas a expressão de *ptxR* a partir do promotor P2 é mediada indiretamente por FUR através da expressão ferro-regulada do gene *pvdS*. Em condições aeróbicas a expressão de *ptxR* mediada por *pvdS* é independente de FUR (Vasil *et al.*, 1998).

A homologia obtida para 1.8 pode estar indicando que se trata de um transcrito cuja expressão é regulada do mesmo modo que o gene *ptxR*, por um sistema semelhante ao observado em bactérias. A análise de *Northern blotting* permitiu ainda estimar o tamanho do transcrito correspondente ao fragmento 1.8, sendo verificado que este possui aproximadamente 1.690 pb.

A análise de *Northern blotting* para os cDNAs 1.11 e 1.15 confirmou que a expressão destes transcritos é regulada pela disponibilidade do ferro(III) sendo que o tamanho estimado para os transcritos completos foi de 2.050 pb e 1.700 pb, respectivamente. Por esta análise verificou-se, que a expressão de 1.11 e de 1.15 foi maior na condição de ausência de ferro(III), mas houve também expressão em menor quantidade na condição de suprimento de ferro. Para o transcrito 1.11 verificou-se uma expressão de 100% na condição de carência de ferro(III) no meio e de 29% quando o ferro(III) estava presente no meio. Para 1.15 a expressão foi de 100% no micélio crescido sem ferro(III) disponível e de 11% quando o crescimento foi em meio

com ferro(III). Na figura 7 estão mostrados os resultados obtidos no *Northern blotting* utilizando estes fragmentos como sonda.

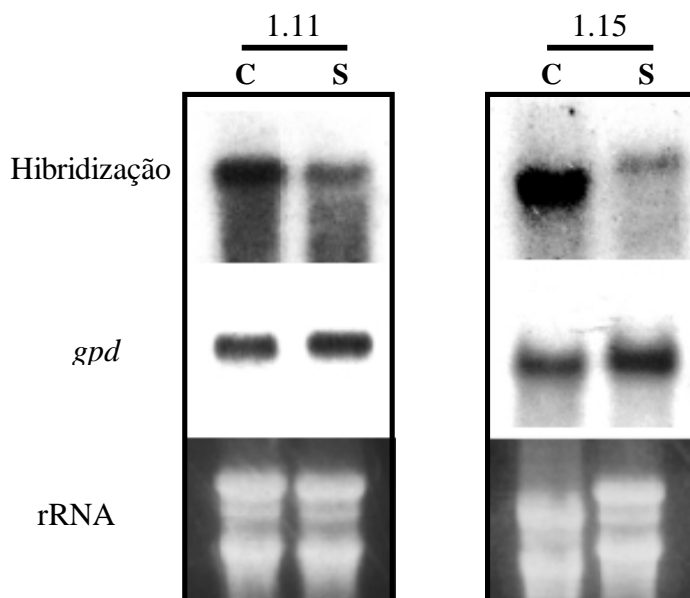


Figura 7. Análise de *Northern blotting* para os fragmentos 1.11 e 1.15, isolados de *P. chrysosporium*. Condições de cultivo: C= carência de ferro(III) no meio e S= suprimento de ferro(III) no meio de cultivo. Na figura estão mostrados os resultados da hibridização: do fragmento marcado radiativamente, da sonda *gpd* usada para normalização da quantidade de RNA na membrana; e, gel de agarose 1% com as amostras de RNA total (rRNA).

Como mostrado na Tabela 1, a sequência de aminoácidos codificada pelo fragmento 1.11 alinhou com um receptor TonB dependente, de *Caulobacter crescentus*, apresentando identidade de 51%. Como citado anteriormente, TonB é uma proteína de membrana que juntamente com as proteínas ExbB e ExbD, formam um complexo localizado na membrana citoplasmática de bactérias, o qual participa do transporte dos sideróforos em bactérias (Moeck & Coulton, 1998). Vários estudos têm mostrado que proteínas da membrana externa envolvidas no transporte de diferentes complexos de ferro(III)-sideróforos possuem uma região na extremidade N-proximal denominada TonB *box* que interage com a proteína TonB (Moeck & Coulton, 1998; Braun & Braun, 2002b). Este sistema de transporte através da membrana externa têm sido denominado transporte ativo da membrana externa TonB-dependente (Braun & Braun, 2002a). Em *Rhizobium leguminosarum*, foi verificado que

mutações no gene homólogo ao *tonB* desta bactéria bloqueiam a captação do sideróforo vicibactina. Também foi observado que a transcrição de *tonB* é aumentada em condições de crescimento com baixa disponibilidade de ferro (Wexler *et al.*, 2001).

A homologia com proteínas TonB foi observada para outro fragmento (C5.4e) isolado neste estudo, como discutido no Capítulo 2. Este fragmento foi isolado utilizando-se a técnica de *display* diferencial, a partir de micélio de *P. chrysosporium* crescido em meio com carência de ferro(III) da mesma forma que o fragmento 1.11. O fragmento C5.4e codifica parte de uma proteína mostrou homologia com uma proteína TonB de *Rhizobium leguminosarum*, com uma identidade de 48%, e a análise de *Northern blot* para este fragmento mostrou que a transcrição do mesmo estava bastante aumentada para o micélio crescido com carência de ferro(III), quando comparada com a expressão verificada no micélio crescido com suprimento de ferro(III) aos 10 dias de cultivo. Desta forma, os resultados referentes à regulação da expressão ferro-dependente para os transcritos 1.11 (neste capítulo, Figura 7) e C5.4e (Capítulo 2, Figura 3) mostram uma mesma tendência de aumento da expressão devida à carência de ferro no meio de cultivo. Estes resultados permitem sugerir a existência de um mecanismo de transporte de sideróforos TonB-dependente para a captação de ferro em *P. chrysosporium* similar ao descrito em bactérias.

A sequência de aminoácidos deduzida para o transcrito 1.15 mostrou homologia, com identidade de 39%, com uma proteína da família de acetiltransferases de *Caenorhabditis elegans*. Este transcrito teve sua expressão bastante aumentada (100%) na condição de carência de ferro quando comparado com a expressão verificada quando o micélio foi cultivado em meio com suprimento de ferro(III) sendo a intensidade de expressão de 11%. Entretanto, o papel do ferro na expressão das acetiltransferases não foi encontrado na literatura.

Para o micélio crescido em condições de crescimento com disponibilidade de ferro(III), somente dois fragmentos foram sequenciados devido ao fato de que o tamanho dos fragmentos clonados ter sido bastante homogêneo. A análise de *Northern blot* confirmou a expressão diferencial regulada pela presença de ferro no meio somente para o fragmento 2.3 (Figura 8), sendo que o tamanho estimado para o transcrito completo foi de 2.100 pb.

Para o fragmento 2.46 não foi observada hibridização da sonda com o RNA total na membrana independentemente da condição de crescimento do micélio. Como discutido

anteriormente uma possibilidade para que não tenha se observado sinal de hibridização para o fragmento 2.46 é o fato de que este transcrito possa ser expresso em quantidades baixas e desta forma não foi detectada a expressão através da análise de *Northern blot*.

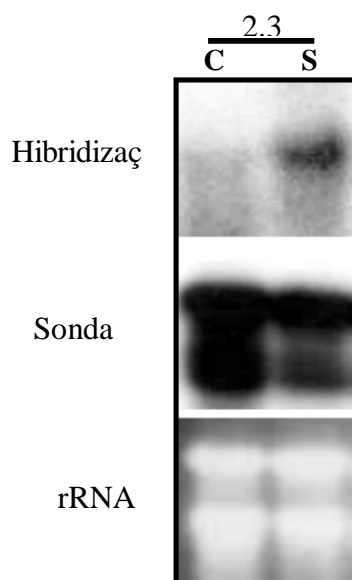


Figura 8. Análise de *Northern blotting* para o fragmento 2.3 isolado de *P. chrysosporium*. Condições de cultivo: C= carência de ferro(III) no meio e S= suprimento de ferro(III) no meio de cultivo. Na figura estão mostrados os resultados da hibridização: do fragmento marcado radiativamente, da sonda 26S de milho usada para normalização da quantidade de RNA na membrana; e, gel de agarose 1% com as amostras de RNA total (rRNA).

O alinhamento da seqüência do fragmento 2.3 com seqüências depositadas no GenBank permitiu verificar a homologia entre a seqüência de aminoácidos deduzida para este fragmento com proteínas da família GATA de diferentes espécies de fungos (Tabela 1).

Verificou-se uma identidade de 54% com as proteínas SREA e SREP envolvidas na regulação da biossíntese de sideróforos em *A. nidulans* e *P. chrysogenum* respectivamente, e uma identidade de 48% com o fator GATA de *N. crassa*, também envolvido na rota biossintética de sideróforos. Como citado anteriormente, as proteínas SREP e principalmente SREA e SRE são fatores de transcrição que participam da regulação da biossíntese de sideróforos nos fungos em que são produzidas (Zhou *et al.*, 1998; Zhou & Marzluf, 1999; Harrison & Marzluf, 2002; Haas *et al.*, 1997; Haas *et al.*, 1999). Embora o papel do ferro na

regulação destas proteínas não tenha sido totalmente elucidado (Harrison & Marzluf, 2002), em *N. crassa* foi verificado que a regulação de SRE é dependente da concentração de ferro no meio de crescimento, entretanto, não é conhecido se as células percebem o ferro extracelular ou intracelular. Ainda, sob condições de baixa disponibilidade de ferro, SRE parece auxiliar na manutenção da síntese de sideróforos em um nível ótimo, sendo sugerido que SRE poderia detectar ou responder à concentração celular de ferro funcionando no mínimo em duas rotas diferentes, que envolvem interações com outros fatores regulatórios para controlar a biossíntese em questão (Zhou & Marzluf, 1999).

Em *A. nidulans*, Haas *et al.* (1999) verificaram que a transcrição de *sreA* é restrita a condições de alta concentração de ferro(III), sugerindo a função da proteína SREA como repressora da biossíntese de sideróforos sob condições de suprimento de ferro. Entretanto, foi verificado que uma superexpressão de *sreA* não resultou na repressão da síntese de sideróforos sob condições de concentração de ferro baixa. Os resultados obtidos até o momento, indicaram que um mecanismo de regulação pós-transcricional está envolvido na ativação da função de repressor para SREA, SRE e Urbs1 (Haas *et al.*, 1997; Zhou & Marzluf, 1999; Haas *et al.*, 1999).

Os alinhamentos obtidos pelo **BLASTX** (Tabela 1) entre a sequência de aminoácidos deduzida para o fragmento 2.3 e a sequência das proteínas SREA e SREP estão mostrados à seguir:

AAC49628.1 Fator de transcrição GATA, SREP *Penicillium chrysogenum*
 Length = 532 Score = 27.3 bits (59), Expect = 68
 Identities = 13/24 (54%), Positives = 16/24 (66%), Gaps = 1/24 (4%)
 Frame = +1

Query: 1 CNACGL-STPLWRRSSARAFLESA 69
 C+ CG STPLWRRS A+ +A
 Sbjct: 94 CSNCGTKSTPLWRRSPTGAMICNA 117

AAD25328.1 Siderophore biosynthesis repressor SREA *Emericella nidulans*
 Length = 549 Score = 27.3 bits (59), Expect = 68
 Identities = 13/24 (54%), Positives = 16/24 (66%), Gaps = 1/24 (4%)
 Frame = +1

Query: 1 CNACGL-STPLWRRSSARAFLESA 69
 C+ CG STPLWRRS A+ +A
 Sbjct: 106 CSNCGTKSTPLWRRSPTGAMICNA 129

Também foi feito o alinhamento da ORF de 2.3 (*frame* +3) deduzida com o auxílio do programa Gene Runner V. 3.00 utilizando-se o algoritmo **BLASTP**. Os alinhamentos obtidos com as proteínas SREA e SREP estão mostrados à seguir:

AF095898 siderophore biosynthesis repressor SREA *Emericella nidulans*

Length = 549 Score = 30.1 bits (66), Expect = 2.3

Identities = 19/46 (41%), Positives = 24/46 (51%), Gaps = 5/46 (10%)

Query: 4 CNACGL-STPLWRRSSARAFLESA----LRSRRSGACKRGRNRNRS 44

C+ CG STPLWRRS A+ +A L++R KR R S

Sbjct: 106 CSNCGTKSTPLWRRSPTGAMICNACGLYLKARNVARPTKRNRTQAS 151

U48414 SreP *Penicillium chrysogenum*

Length = 532 Score = 29.3 bits (64), Expect = 4.0

Identities = 18/42 (42%), Positives = 23/42 (53%), Gaps = 5/42 (11%)

Query: 4 CNACGL-STPLWRRSSARAFLESA----LRSRRSGACKRGR 40

C+ CG STPLWRRS A++ A L++R KR R

Sbjct: 94 CSNCGTKSTPLWRRSPTGAMICNACGLYLKARNVARPTKRN 135

A existência de similaridade com as proteínas da família GATA, SREA, SREP e SRE poderia permitir a sugestão de que uma proteína da família GATA em *P. chrysosporium* poderia funcionar como um repressor da biossíntese de sideróforos. Como o fragmento 2.3 foi isolado a partir de RNA total expresso em células de micélio crescido sob condições de alta concentração de ferro no meio, poderia sugerir-se que este tenha um papel regulatório no metabolismo do ferro para este fungo e as homologias observadas permitiriam indicar que este estaria relacionado com a rota biossintética de sideróforos. Entretanto, para elucidar o papel deste gene em *P. chrysosporium* seria necessário o isolamento do gene completo e sua caracterização. Tentativas realizadas neste sentido estão descritas a seguir nos Capítulos 4 e 5.

Para *L. edodes*, como mostrado na Tabela 2, dois fragmentos isolados de micélio crescido em meio com carência de ferro(III) e inúmeros fragmentos isolados de micélio do fungo crescido em meio com suprimento de ferro(III) foram sequenciados e alinhados com seqüências depositadas no GenBank, e tiveram sua expressão regulada por ferro analisada pelo método de *Northern blotting*. Entretanto, esta análise permitiu confirmar a expressão ferro-regulada somente para os fragmentos 3.28 e 3.48 (Figura 9) obtidos de micélio crescido em condições de carência de ferro(III).

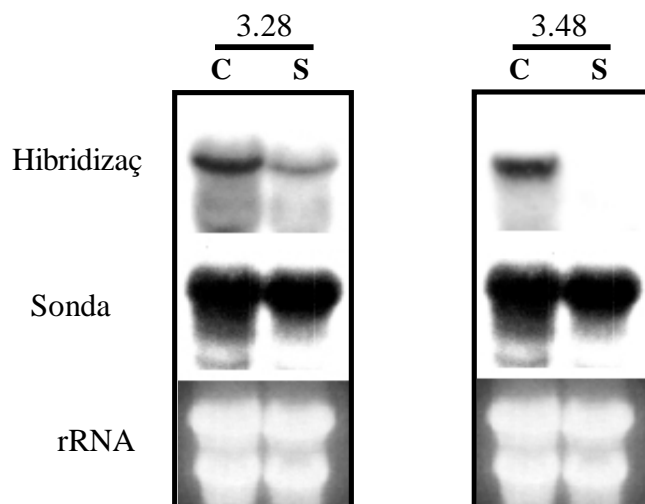


Figura 9. Análise de *Northern blotting* para os fragmentos 3.28 e 3.48, isolados de *L. edodes*. Condições de cultivo: C= carência de ferro(III) no meio e S= suprimento de ferro(III) no meio de cultivo. Na figura estão mostrados os resultados da hibridização: do fragmento marcado radiativamente, da sonda 26S de milho usada para normalização da quantidade de RNA na membrana; e, gel de agarose 1% com as amostras de RNA total (rRNA).

Para o fragmento 3.28, com tamanho total do transcrito estimado em 3.000 pb, foi observada a expressão diferencial aumentada na condição de crescimento de carência de ferro(III), sendo que foi observada expressão do mesmo também na condição de suprimento de ferro(III) em menor quantidade, como mostrado na Figura 9. A quantificação do sinal de hibridização obtida nas duas condições de crescimento permitiu verificar que a expressão deste transcrito é de 100% no meio sem disponibilidade de ferro(III) e de 28% no meio com ferro(III) disponível. O alinhamento da sequência deduzida da proteína codificada por 3.28 com sequências do banco de dados permitiu verificar uma identidade desta de 28% com as proteínas Fre1p e Fre2p de *S. cerevisiae*. Como discutido anteriormente, estas proteínas são metaloredutases presentes na membrana plasmática e são requeridas para a redução do ferro(III) que dissociado do complexo com o sideróforo pode ser transportado para o interior da célula com o auxílio de proteínas de membrana que possuem alta afinidade por ferro, tal como a FET3 e a TAF1 (Martins *et al.*, 1998; Yun *et al.*, 2001; Kosman, 2003). Este sistema é expresso sob condições de carência de ferro e está sob controle de Aft1p, o maior fator de transcrição dependente de ferro das leveduras (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1995; Yun *et al.*, 2001;

Yamaguchi-Iwai *et al.*, 2002). Segundo Yamaguchi-Iwai *et al.* (1996), condições de carência de ferro resultam na indução na expressão de *FET3*, *FRE1* e *FRE2*, sendo que a regulação da expressão destes genes ocorre no nível da transcrição e é mediada por Aft1p. A função de Aft1p é inativada sob condições de disponibilidade de ferro de forma que este fator de transcrição não se ligue a uma região do DNA envolvida na regulação dos genes requeridos para a captação de ferro (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 2002).

Desta forma a confirmação da expressão de 3.28 aumentada pela carência de ferro no meio de cultivo fornece indícios de que o fungo *L. edodes* possui um sistema de captação de ferro que envolveria proteínas de membrana (redutases) similares às existentes em *S. cerevisiae*.

Também o fragmento 3.48 isolado em condições de carência de ferro teve a sua expressão regulada por este metal confirmada por *Northern blotting*, como mostrado na Figura 9. A expressão deste transcrito, de cerca de 2.150 pb, foi induzida somente na condição de carência de ferro. A sequência de aminoácidos codificada por 3.48 mostrou homologia com 39% de identidade com um ativador da transcrição da D-serina desidratase de *E. coli*, sendo que o papel do ferro na expressão deste gene não foi descrito na literatura.

Por último, vários fragmentos isolados para *L. edodes*, crescido em meio com suprimento de ferro mostraram homologia com a aspartil-tRNA sintetase de *S. cerevisiae* (Tabela 2), embora o papel do ferro na expressão destes transcritos não tenha sido confirmado como discutido anteriormente. O gene nuclear de *S. cerevisiae* *MSD1* codifica a aspartil-tRNA sintetase mitocondrial neste fungo (Gampel & Tzagoloff, 1989), a qual está envolvida na expressão de genes mitocondriais que codificam tRNAs e é requerida para a manutenção do genoma mitocondrial (Chiang & Liaw, 2000).

4. Conclusões

A abordagem utilizada nesta etapa do estudo permitiu o isolamento de seis transcritos de *P. chrysosporium* cuja expressão é regulada por ferro, sendo que 5 destes foram expressos exclusivamente (1.1, 1.3 e 1.8) ou com expressão aumentada (1.11 e 1.15) devido à carência de ferro no meio de cultivo; e, 1 transcrito teve sua expressão induzida pela presença de ferro no meio (2.3). Para *L. edodes* inúmeros transcritos foram isolados, entretanto somente dois transcritos tiveram sua expressão, induzida (3.48) ou aumentada (3.28) como resposta à carência de ferro(III) no meio de cultivo, confirmada por *Northern blotting*.

Dos transcritos isolados, os fragmentos 1.3 (1.2 e 1.7), 1.11 e 3.28 codificam parte de proteínas que mostraram homologias com proteínas envolvidas em vias de captação de ferro, tais como a TonB (1.11), a Fre1p e a Fre2p (3.28) envolvidas em sistemas de transporte de ferro(III) ou de complexos ferro-sideróforos em bactérias e fungos respectivamente; ou de outros metais tal como a ZnT2 (1.3) relacionada com o transporte de zinco. Ainda, a sequência de aminoácidos deduzida para dois fragmentos mostraram homologias com proteínas de duas famílias de reguladores de transcrição, a família LysR (1.8) e a família GATA (2.3), sendo que estas duas famílias possuem um papel importante na regulação da síntese de sideróforos em bactérias e fungos, respectivamente.

O objetivo desta etapa do trabalho foi alcançado uma vez que foi isolado um cDNA parcial (2.3) cuja expressão é regulada positivamente por ferro(III) em *P. chrysosporium* o qual foi homólogo aos reguladores da transcrição GATA, SRE, SREA e SREP envolvidos na biossíntese de sideróforos de diferentes espécies de fungo os quais sugere-se que sejam também regulados por ferro. Entretanto, o tamanho do fragmento 2.3 (204 pb) torna necessária a realização de novos experimentos para se buscar o isolamento do cDNA completo o que permitirá confirmar se 2.3 codifica uma proteína GATA.

Por fim, os resultados obtidos parecem sugerir a existência de mecanismos de transporte de ferro(III) baseados em sideróforos no caso de *P. chrysosporium*, ou ainda baseados em sistemas de transporte altamente coordenados semelhantes aos de levedura no caso de *L. edodes*.

Capítulo 4

**Isolamento de genes utilizando *primers* específicos
desenhados com base na sequência do fragmento 2.3**

1. Introdução

O método RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) foi desenvolvido inicialmente por Frohman *et al.* (1988). Este método, consiste basicamente na amplificação de cDNA de seqüências nucleotídicas usando o mRNA como molde sendo a amplificação a partir de um sítio interno definido (conhecido) em direção à extremidade 3' ou 5'. Entre os pré-requisitos para a aplicação desta técnica estão o conhecimento de pelo menos uma pequena região da seqüência que se quer isolar (Frohman *et al.*, 1988) e o uso na reação de amplificação de dois *primers* específicos que flanqueiam a seqüência que se quer amplificar. Desta forma, dependendo da extremidade que se quer estudar pode-se realizar uma amplificação 3' RACE ou 5' RACE (Figura 1).

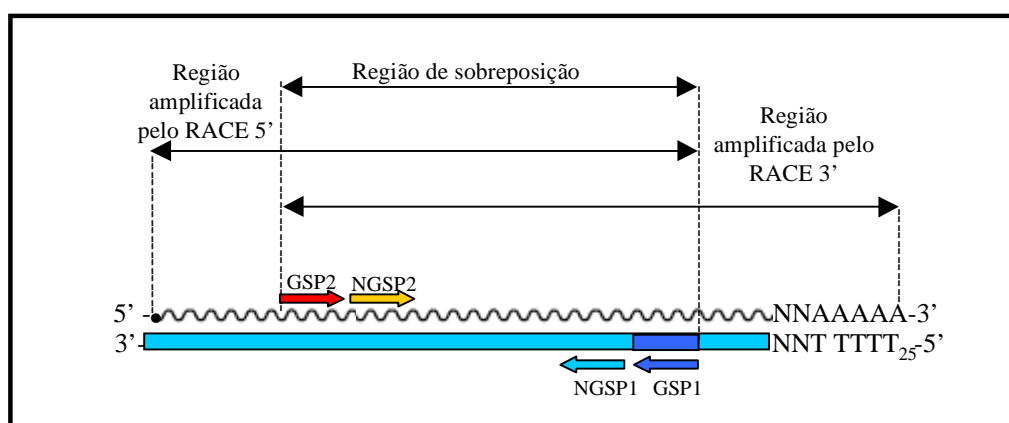


Figura 1. Diagrama resumido da síntese de cDNA pelo método SMARTTM (Clontech) 3' RACE e 5' RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*). GSP= *Gene Specific Primer* e NGSP= *Nested Gene Specific Primer*. Diagrama retirado do *User Manual* (Clontech).

Uma estratégia de geração de cDNAs pelo método RACE é o método de amplificação SMARTTM RACE cDNA (Clontech), o qual fornece um mecanismo para a obtenção de cDNAs completos na reação de transcrição reversa. Isto é possível pela ação conjunta do *primer* SMART IITM e pelo uso de uma transcriptase reversa tal como a Superscript II, sendo que certas variantes desta enzima mostram atividade de terminal transferase adicionando 3-5 resíduos (predominantemente dC) na extremidade 3' da primeira fita do cDNA (SMART IITM RACE cDNA Amplification Kit, User's Manual). Como o *primer* SMART IITM possui uma

extensão de resíduos dG na porção 3' este pode se anelar à porção de resíduos dC-rica da cauda do cDNA funcionando como uma extensão reconhecida pela transcriptase reversa que resulta em uma elongação da extremidade 5' do cDNA durante a síntese da primeira fita de cDNA (Figura 2). Ainda o *primer* SMART IITM possui na extremidade 5' uma porção adaptadora que é adicionada à fita do cDNA. Após a obtenção do cDNA, no primeiro *round* de amplificação é usada a mistura fornecida pelo sistema denominada UPM (*Universal Primer Mix*) a qual contém dois *primers*, o *primer* universal longo e o *primer* universal curto. O *primer* longo, na porção 3' é homologa à porção adaptadora adicionada pelo *primer* SMART IITM anelando com a fita de cDNA para a amplificação, e na extremidade 5' este *primer* longo contém uma região adaptadora adicional, a qual é homologa a sequência do *primer* universal curto. Desta forma no primeiro ciclo de amplificação (PCR) o *primer* longo anela-se à porção adaptadora adicionada pelo *primer* SMART IITM na síntese das fitas de cDNA, adicionando uma segunda porção adaptadora 5'. No segundo ciclo de amplificação esta porção adaptadora é fixada e nos ciclos posteriores a amplificação é dirigida pelo *primer* curto presente no UPM e o *primer* gene-específico. O *primer* curto é homólogo somente à porção adaptadora 5' adicionada no produto de amplificação. Representações deste processo estão mostradas nas Figuras 1 e 2.

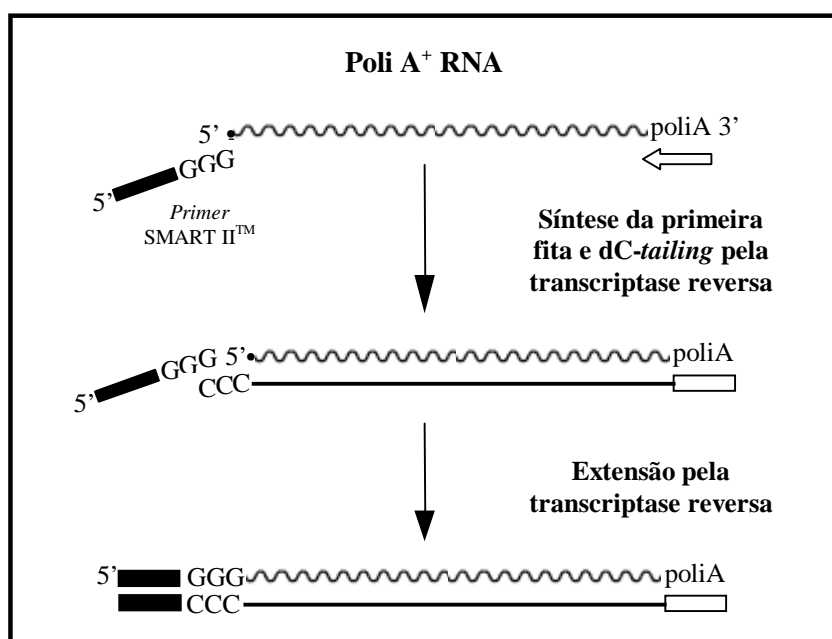


Figura 2. Mecanismo do sistema SMARTTM para a síntese de cDNA.

Na presente etapa do estudo, o sistema RACE desenvolvido pela Clontech foi utilizado para se buscar o isolamento do cDNA completo correspondente ao fragmento 2.3 de *P. chrysosporium*, que foi isolado utilizando-se *primers* degenerados desenhados com base nas seqüências altamente conservadas dos domínios de ligação ao DNA do tipo dedos de zinco das proteínas da família GATA, como descrito no Capítulo 3. Este fragmento tornou-se interessante ao estudo porque mostrou identidade de 54% com as proteínas SREA e SREP envolvidas na regulação da biossíntese de sideróforos em *A. nidulans* e *P. chrysogenum* respectivamente, e de 48% com o fator GATA de *N. crassa*, também envolvido na rota de síntese de sideróforos. Para tanto, foram desenhados dois *primers* específicos para o domínio GATA de *P. chrysosporium* uma vez que a seqüência de 204 pb do fragmento 2.3 continha a seqüência referente a estes domínios, e também dois *primers* flanqueando esta região.

Desta forma, neste capítulo estão descritos os procedimentos adotados e os resultados obtidos na tentativa de se isolar o cDNA completo referente à seqüência do fragmento 2.3.

2. Materiais e métodos

Para a execução dos experimentos descritos neste capítulo, micélio de *P. chrysosporium* BKM 1767 foi crescido em meio líquido de extrato de malte 2% sob agitação por 10 dias a 28°C em duas situações diferenciais: a) com disponibilidade de ferro(III) no meio (90 µM de FeCl₃) visando a repressão da produção de sideróforos e, b) sem ferro(III) ou com concentração de ferro(III) muito reduzida para indução da produção de sideróforos. Os micélios obtidos foram filtrados e estocados em freezer – 80°C para posterior utilização.

2.1 Síntese de cDNA

Os cDNAs usados nos experimentos descritos neste capítulo foram sintetizados com sistema de amplificação SMARTTM RACE cDNA (Clontech).

Como mostrado nas Figuras 1 e 2, apresentadas acima, e na Figura 3 abaixo, o sistema SMARTTM RACE cDNA *Amplification* baseia-se na utilização de *primers* específicos GSP (*Gene Specific Primer*) e NGSP (*Nested Gene Specific Primer*), em reações de amplificação usando cDNA específico para o gene que se deseja isolar.

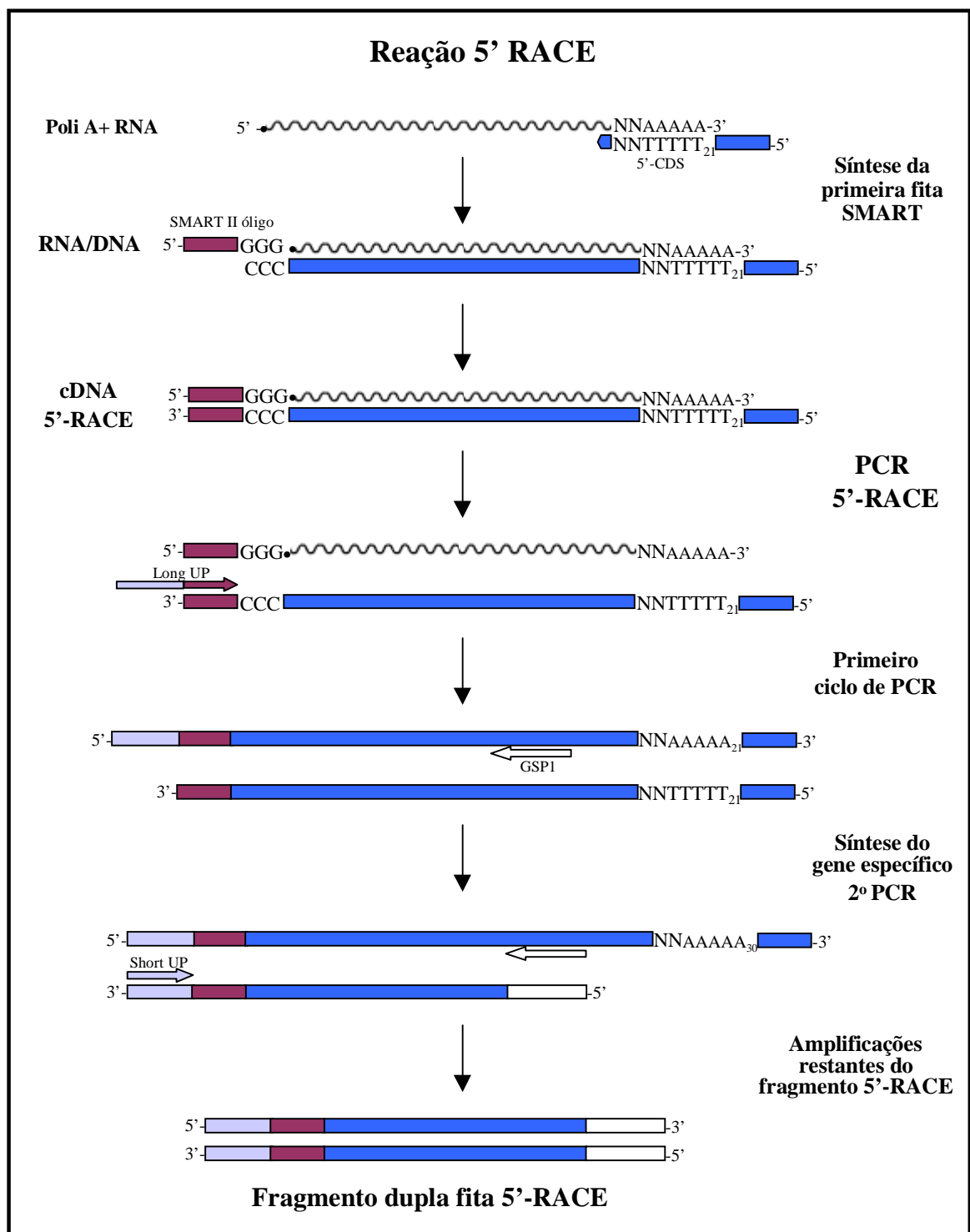


Figura 3. Esquema detalhado da síntese de cDNA pelo sistema de amplificação 5' SMARTTM RACE cDNA (Clontech). UP= *Universal Primer*, GSP1= *Gene Specific Primer*. Esquema retirado do *User Manual* (Clontech).

Partindo-se do pressuposto de que o fragmento 2.3 codificaria um fator de transcrição GATA e tendo-se observado que a sequência do fragmento 2.3 possui uma região rica em adeninas (Figura 4) o que poderia estar indicando o terminal 3' da sequência (cauda poliA) e somando-se o fato de que a *ORF* que mostrou homologia com SREP, SREA e SRE é codificada no sentido direto, decidiu-se produzir fitas de cDNA 5' RACE (Figura 3), para buscar a obtenção da sequência completa do transcrito referente ao fragmento 2.3. Para tanto, com base na sequência de 2.3 foram desenhados inicialmente dois *primers anti-sense*, um *primer* gene-específico (GSP1) e um *primer nested* gene-específico (NGSP1), como mostrado na Figura 4 e na Tabela 1. Posteriormente foram desenhados outros dois *primers*, um gene-específico chamado de GSP2 e o outro gene-específico *nested* chamado de NGSP2, os quais contêm as sequências específicas para os *primers* degenerados Urbs1-1 (5'-ARNCCRCANGCRTTRCA-3') e Urbs1-2 (5'-TGAAAYGCNTGYGGNYT-3'), respectivamente (Figura 4 e Tabela 1).

TGTAACGCGTGCGGGCTGTCTACGCCGCTGTGGAGACGATCCTCCGCGAGAGCTTTCCT
GGAAAGTGCGCTGCGTTTCGAGAAGGAGTGGGGCATGCCTGAAGCGTGGACGGCGAAAT
CGCTCCTCATGCAGGTGTTACTATCGATGGACGACTACTATCCCAAAGAACCCGGTGCA
GGTCTCTGGGATGGAGCCTGAACTTTGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Figura 4. Sequência de nucleotídeos obtida para o fragmento 2.3 juntamente com a cauda poli(A), marcada em negrito. Em traço pontilhado estão mostrados os *primers* GPS1 e NGPS1 e os *primers* GPS2 e NGPS2 estão sublinhados.

Tabela 1: *Primers* desenhados a partir da sequência do fragmento 2.3.

Nome do <i>Primer</i>	Sequência
GPS1	5'- ACACCTGCATGAGGAGCGATTTTCG-3'
NGPS1	5'-ACTCCTTCTCGAACGCAGCGCACTT-3'
GPS2	5'- ACGCCGCTGTGGAGACGA-3'
NGPS2	5'- TGTAACGCGTGCGGGCTG-3'

Para a síntese de cDNA procedeu-se a extração de RNA total de *P. chrysosporium* para as diferentes condições de disponibilidade de ferro(III) utilizando-se o método de (item 2.3.1, Capítulo 3). O RNA total obtido foi usado como molde na síntese de cDNA 5' RACE, através da seguinte mistura de reação: 1 µg de RNA total, 1 µL do *primer* 5'-CDs e 1 µL do *primer* SMART II. Esta reação foi misturada e incubada por 2 min a 70°C e logo após mantida por 2

min no gelo. Em seguida, acrescentou-se à reação anterior 5 µL da mistura: 2 µL do tampão 5X *first strand*, 1 µL de DTT 20 mM, 1 µL da mistura de dNTPs 10 mM e 200 U da enzima SuperScript II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (InvitrogenTM). Incubou-se a reação a 42°C por 1 h e 30 min e, em seguida acrescentou-se 100 µL de Tricine-EDTA. A reação foi incubada por 7 min a 72°C e após foi aliquoteada e estocada a -20°C.

2.2 Reações de PCR

Para a obtenção de cDNA específico foram feitas reações de amplificação compostas de 1-3 µL de cDNA (5' SMART RACE), 3 µL do *primer* específico GPS1 ou GPS2 10 µM, 2 µL *primer* UPM 10X fornecido pelo sistema, 2 µL da mistura de dNTPs 5 mM, 5 µL do tampão de amplificação 10X, 1,5 µL de MgCl₂ 50 mM, 2,5 U de *Taq* DNA Polimerase (Amersham Biosciences) e H₂O desionizada para um volume final de 50 µL. Os ciclos de amplificação foram: desnaturação a 94°C (4 min), seguida de 39 ciclos de 94°C (1 min), 62°C (2 min) e 72°C (2 min), com extensão final de 62°C (5 min) e 72°C (7 min).

2.3 PCR *nested*

O produto obtido na primeira reação de amplificação foi utilizado como molde em uma reação de PCR *nested*, sendo a reação formada por: 1-3 µL do produto da primeira PCR, 2 µL do *primer* específico *nested* NGSP1 ou NGSP2 10 µM, 2 µL do *primer* NUP (*Nested Universal Primer*) 10 µM fornecido no sistema, 2 µL da mistura de dNTPs 5 mM, 5 µL do tampão de amplificação 10X, 1,5 µL de MgCl₂ 50 mM, 2,5 U de *Taq* DNA Polimerase (Amersham Biosciences) e H₂O desionizada para um volume final de 50 µL. As condições de amplificação foram as mesmas usadas na primeira PCR.

Os fragmentos obtidos foram clonados no vetor pGEM®-T Easy (Promega), como descrito no Capítulo 3, item 2.3.5. Para a reação de ligação foram usados produtos de PCR obtidos tanto nas primeiras reações de amplificação como nas PCRs *nested*, como será discutido à seguir. Os procedimentos utilizados para a mini-preparação dos plasmídios dos clones “recombinantes”, para o sequenciamento dos fragmentos e para a análise de *Northern blotting* para confirmação da expressão diferencial regulada por ferro(III) dos transcritos sequenciados estão descritos no item Material e Métodos do Capítulo 3.

3. Resultados e discussão

Como descrito no Capítulo 3 obteve-se para *P. chrysosporium* crescido em meio com suprimento de ferro(III), o fragmento de cDNA 2.3 cuja sequência de cerca de 204 pb contém uma *ORF* que mostrou identidade de 54% com sequência das proteínas SREA e SREP de *A. nidulans* e *P. chrysogenum* e de 48% com SRE de *N. crassa*, envolvidas na regulação da biossíntese de sideróforos destes fungos. O fragmento seqüenciado foi isolado a partir de RNA total expresso em células de micélio crescido sob condições de alta concentração de ferro no meio, de forma que inicialmente pode-se sugerir que o ferro parece estar regulando a expressão do gene.

Com esse resultado, o passo seguinte foi buscar isolar o cDNA completo do gene. Para tanto, decidiu-se utilizar a metodologia SMARTTM RACE cDNA *Amplification* (Clontech) para obtenção de cDNAs completos, sendo sintetizado cDNA 5' RACE devido ao fato de que a sequência obtida para 2.3 possui uma região poli(A) na extremidade 3' podendo indicar que o fragmento isolado seria o final do gene de interesse, além disso a homologia foi com a sequência do *frame* +3. Desta forma, foram sintetizados cDNAs para as duas condições de concentração de ferro no meio de cultivo (carência e suprimento). Os cDNAs obtidos foram usados em reações de PCR e PCR *nested* utilizando-se dois *primers* gene-específicos e dois *primers nested* gene-específicos (Tabela 1). Inicialmente foram realizadas amplificações com os *primers* GSP1 e UPM, para as duas condições de crescimento (Figura 5, linhas 1 e 2) e após, foram realizados PCRs *nested* usando os produtos da primeira PCR juntamente com os *primers* NGSP1 e NUP (*Nested Universal Primer*, fornecido pelo sistema), para as duas condições de crescimento (Figura 5, linhas 3 e 4).

Não foi observada amplificação específica na PCR *nested* (Figura 5). Na tentativa de se obter um melhor resultado na amplificação, a temperatura de anelamento foi alterada de 62°C para 60°C e também foram feitas diluições da primeira PCR (1/10, 1/20 e 1/50) sendo usados 3 µl da diluição na reação de amplificação. Entretanto, estas modificações não alteraram o resultado (não mostrado).

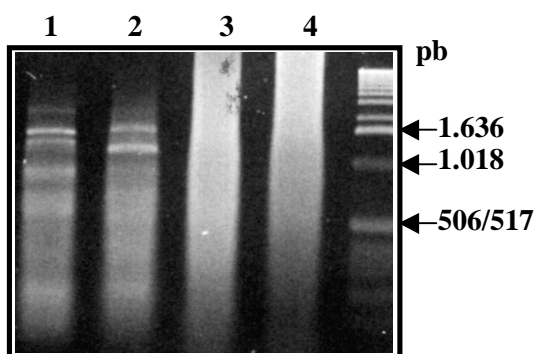


Figura 5. Produto da reação de amplificação com cDNA 5' RACE. Amostras: **1.** *P. chrysosporium* sem ferro(III), *primers* UMP e GSP1; **2.** *P. chrysosporium* com ferro(III), *primers* UMP e GSP1; **3.** *P. chrysosporium* sem ferro(III), *primers* NUP e NGSP1; e, **4.** *P. chrysosporium* com ferro(III), *primers* NUP e NGSP1. Marcador de peso molecular 1Kb (InvitrogenTM).

Desta forma, decidiu-se clonar o produto da primeira PCR, usando os *primers* **UPM** e **GSP1** (Figura 5, linhas 1 e 2). Para a reação de ligação do fragmento no vetor foram utilizados 3 µl do produto da primeira PCR, sendo que a ligação para a amostra sem ferro(III), foi denominada “5” e os clones obtidos 5.x e, a ligação para a amostra crescida com ferro(III) “6”, sendo os clones obtidos identificados como 6.x.

Os clones 6.x foram sequenciados uma vez que foram obtidos de micélio crescido em meio com suprimento de ferro(III) e as seqüências obtidas foram alinhadas com seqüências depositadas no GenBank para verificar a existência de homologias significativas. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 2.

Os fragmentos inseridos nos clones 6.x e nos demais clones apresentados neste Capítulo foram sequenciados no sentido direto e reverso utilizando-se os *primers* -40 M13 *foward* 23mer e SP6, respectivamente. Embora muitos dos fragmentos obtidos tenham um

tamanho, estimado a partir da digestão com a enzima de restrição *EcoR* I em gel de agarose, relativamente grandes, optou-se por apresentar somente os resultados obtidos para a sequência direta. Verificou-se por análise comparativa com as sequências depositadas no banco de dados do Projeto Genoma de *Phanerochaete chrysosporium* (**White Rot Genome Project**, iniciado em 2001) que as sequências reversas correspondiam a uma fração do mesmo transcrito. Ainda, os resultados obtidos na comparação da sequência direta e reversa de cada clone com as sequências do GenBank pelo BLASTX mostraram homologias correspondentes.

Tabela 2. Resultados obtidos no alinhamento dos clones 6.x, de amostra crescida com suprimento de ferro(III) no meio de cultivo.

Fragmento	Tamanho (pb) ^a	Homologias (Número de acesso no GenBank)	Frame	Identidade (%)	Similaridade (%)	Escore, <i>E-value</i>
6.35, 6.43, 6.51, 6.58, 6.62 e 6.73	1.500	Precursor de M poliproteína <i>Puumala virus</i> (CAA43369)	-3	41	58	33, 1,2
6.37	1.250	Proteína hipotética <i>Thermobifida fusca</i> (ZP_00059464)	+3	44	48	34, 0,50
6.39	1.500	Uréia carboxilase putativa <i>Corynebacterium efficiens</i> (NP_737323)	+1	44	66	51, 4e-06
6.40	1.650	Possível proteína vacuolar <i>Schizosaccharomyces pombe</i> (NP_596804)	-1	43	58	43, 8e-04
6.41	1.500	Proteína de reparo MRP3 <i>Homo sapiens</i> (AAB47281)	-3	52	78	27, 0,78
6.44	1.550	2-oxoglutarato desidrogenase, componente E1 <i>S. cerevisiae</i> (CAA86867)	-1	77	87	204, 2e-52
6.50	1.500	L-aminoácido oxidase <i>Rhodococcus opacus</i> (AAL14831)	-2	38	53	32, 2,0

a= tamanho do fragmento estimado com base no marcador de peso molecular 100 pb (InvitrogenTM)

A análise das sequências no banco de dados permitiu verificar fortes homologias entre a sequência dos diferentes fragmentos e sequências de diversas espécies. Entretanto, nenhuma destas refere-se àquela obtida anteriormente para o fragmento 2.3.

A sequência de aminoácidos deduzida para o fragmento 6.40 alinhou com uma glicoproteína de membrana, possivelmente uma proteína receptora vacuolar envolvida em distribuição/endereçamento de *S. pombe*. A proteína deduzida para a sequência deste fragmento também alinhou com a proteína Vps10 (*Vacuolar sorting protein*) de *S. cerevisiae*

com identidade de 34%. A Vsp10 é uma proteína transmembrana tipo I e é requerida para a distribuição da proteína vacuolar solúvel carboxipeptidase Y (CPY) (Marcusson *et al.*, 1994; Cereghino *et al.*, 1995). Em levedura foram identificados mais de 40 genes requeridos para a distribuição de proteínas mediada por vesículas até o vacúolo do tipo lisossoma. Entre estas estão a VPSI e VPS21 que codificam GTPases, e os produtos dos genes VSP33, VSP45 e PEP12/VSP6 os quais são homólogos às proteínas envolvidas na endocitose regulada por vesículas sinápticas. A caracterização molecular destas VSPs tem revelado uma variedade de atividades bioquímicas envolvidas nestes processos, sendo que estas proteínas constituem componentes de um aparato molecular responsável pelo reconhecimento, empacotamento e transporte vesicular de proteínas até o vacúolo em leveduras (Stack *et al.*, 1995). Outros fragmentos obtidos neste trabalho mostraram homologias com proteínas envolvidas no transporte de substratos por meio de vesículas entre estes o fragmento 4.4, isolado como descrito no Capítulo 2 por meio da técnica de *display* diferencial na condição de crescimento de carência de ferro. Também nesta condição de crescimento, foram obtidos os fragmentos 1.3, 1.2 e 1.7 de mesma sequência (Capítulo 3), cuja sequência de aminoácidos alinhou com a proteína transportadora de zinco do tipo ZIP, ZNT2, de *Thlaspi caerulescens* apresentando uma identidade de 44%. Em ratos, a proteína de membrana ZnT2 foi isolada, tendo-se verificado que esta possui um papel de facilitar o sequestro e o acúmulo de zinco em vesículas endossomais (Palmiter *et al.*, 1996). Como discutido anteriormente, em levedura, transportadores expressos em vesículas intracelulares componentes da superfamília de facilitadores principais (MFS-*major facilitator superfamily*) codificados pelos genes *ARN1-ARN4*, participam dos processos de captação de alta afinidade por ferro neste fungo (Heymann *et al.*, 2000b; Philpott *et al.*, 2002; Kosman, 2003). Desta forma, a obtenção de diferentes fragmentos cuja sequência deduzida da proteína apresenta homologia com diversos transportadores envolvidos na captação de enzimas e metais, podem estar indicando um papel importante de um sistema mediado por vesículas intracelulares no transporte de ferro em *P. chrysosporium*.

A sequência deduzida de aminoácidos do fragmento 6.50 alinhou com a L-aminoácido oxidase de *Rhodococcus opacus* com identidade de 38%. Esta oxidase catalisa a desaminação oxidativa dos L-aminoácidos para os ceto ácidos correspondentes, com a redução de oxigênio em peróxido de hidrogênio (Geueke & Hummel, 2002). Em *N. crassa*, o primeiro passo do

catabolismo de muitos aminoácidos é uma desaminação oxidativa catalisada pela L-aminoácido oxidase (Calderón *et al.*, 1997). A região promotora do gene nitrogênio-regulado da L-aminoácido oxidase possui dois sítios de ligação com NIT2, a principal proteína de regulação do nitrogênio neste fungo e um regulador da transcrição da família GATA de proteínas, sendo que cada um destes sítios possui duas cópias da sequência consenso central GATA (Xiao & Marzluf, 1993; Feng *et al.*, 1993). Desta forma, o isolamento do transcrito 6.50 o qual codifica provavelmente uma L-aminoácido oxidase em *P. chrysosporium*, pode ter sido devido à presença de sítios consenso GATA neste tipo de enzimas como em *N. crassa*.

A análise de *Northern blotting* foi realizada somente para os fragmentos 6.39 e 6.44, sendo que não foi observada nenhuma hibridização destes transcritos na membrana com RNA total de *P. chrysosporium*, independentemente da condição de disponibilidade de ferro(III) no meio de cultivo. Este resultado pode ter sido devido ao fato destes transcritos serem expressos em número baixo de cópias. Como a estratégia usada nesta etapa baseou-se na obtenção de fragmentos por meio de reações de amplificação é possível que transcritos com poucas ou muito poucas cópias tenham sido amplificados e desta forma isolados. Desta forma, sendo a técnica de *Northern blotting* de menor sensibilidade, ao se hibridizar o fragmento isolado com o RNA total fixado em membrana de *nylon*, o baixo número de cópias do transcrito expresso dificultaria a detecção da expressão dos mesmos.

Como os fragmentos 6.x isolados não corresponderam ao fragmento 2.3, como era o objetivo desta etapa do estudo, novas PCRs foram feitas, usando os *primers* GSP2 ou NGSP2 e o *primer* UPM. Os resultados obtidos na amplificação estão mostrados na Figura 6.

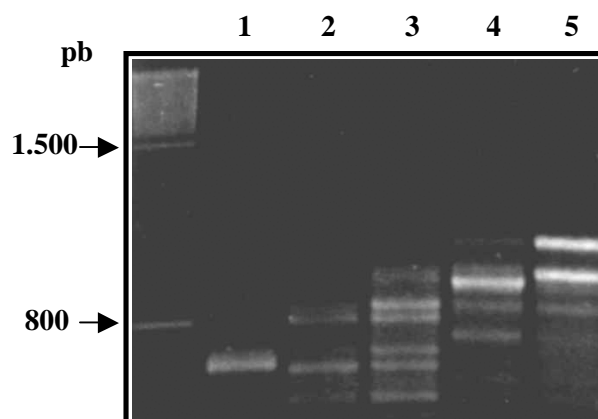


Figura 6. Produto da reação de amplificação utilizando cDNA 5' RACE. Amostras: **1.** *P. chrysosporium* sem ferro(III), *primers* UPM e NGSP2; **2. e 3.** *P. chrysosporium* com ferro(III), *primers* UPM e NGSP2, 0,8 e 1,0 mM de MgCl₂ respectivamente; **4.** *P. chrysosporium* sem ferro(III), *primers* UPM e GSP2; e, **5.** *P. chrysosporium* com ferro(III), *primers* UPM e GSP2. Marcador de peso molecular 100 pb (InvitrogenTM).

O produto de amplificação obtido na reação de PCR com os *primers* **UPM** e **GSP2** a partir de cDNA de *P. chrysosporium* cultivado com suprimento de ferro(III) no meio (Figura 6, linha 5) foi clonado no vetor pGEM®-T Easy (Promega) e os resultados obtidos para o alinhamento das seqüências dos fragmentos 15.x estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Resultados obtidos no alinhamento dos fragmentos 15.x, de amostra crescida com suprimento de ferro(III).

Fragmento	Tamanho (pb) ^a	Homologias (Número de acesso no GenBank)	Frame	Identidade (%)	Similaridade (%)	Escore, <i>E-value</i>
15.4 e 15.33	1.700	Glicoproteína de envelope (AAA73905)	+1	27	38	31, 3,4
15.6 e 15.12	1.400	Provável ATPase transportadora de cálcio <i>S. pombe</i> (NP_592849)	-3	39	60	78, 3e-14
15.35	1.700	Proteína hipotética <i>Homo sapiens</i> (XP_098144)	+3	42	52	32, 2,1
15.37	1.700	s.a.	-	-	-	-

a= tamanho do fragmento estimado com base no marcador de peso molecular 100 pb (InvitrogenTM)

A comparação das seqüências obtidas com as depositadas no banco de dados permitiu verificar similaridade entre a seqüência de aminoácidos deduzida para os diferentes fragmentos e seqüências de diversas espécies. Entretanto, nenhuma destas refere-se ao

fragmento 2.3. A análise de *Northern blotting* foi realizada somente para o fragmento 15.6, sendo que não foi observada nenhuma hibridização deste transcrito na membrana com RNA total de *P. chrysosporium*, independentemente da condição de disponibilidade de ferro(III) no meio de cultivo.

Verificou-se que 15.6 (15.12) apresentou homologia com ATPases de diversas espécies, sendo que a identidade mais significativa (39%) foi com uma provável ATPase transportadora de cálcio *S. pombe*. Em bactérias, o mecanismo mais comum de transporte de substratos, é o sistema ABC (Braun & Killmann, 1999). Estes transportadores, são responsáveis pela absorção de aminoácidos, peptídeos, açúcares, vitaminas, cátions e ânions inorgânicos, ferro, sideróforos complexados com Fe^{+3} e grupos heme ligados a proteínas, além de, exportar certas proteínas, polissacarídeos e compostos tóxicos. Vários *operons* que codificam proteínas da família de transportadores ABC envolvidos no sistema de transporte de ferro de diferentes espécies de bactérias foram estudados, dentre as quais *Staphylococcus epidermis* (Cockayne *et al.*, 1998); *Brachyspira hyodysenteriae* (Dugourd *et al.*, 1999); *Yersinia pestis* (Bearden *et al.*, 1998; Fetherston *et al.*, 1999; Gong *et al.*, 2001); *Serratia marcescens* (Angerer *et al.*, 1992); *Erwinia chrysanthemi* (Mahe *et al.*, 1995); *Serratia aureus* (Horsburgh *et al.*, 2001); *Salmonella typhimurium* (Zhou *et al.*, 1999); *Vibrio cholerae* (Wyckoff *et al.*, 1999); *Staphylococcus aureus* (Morrissey *et al.*, 2000); *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Kato *et al.*, 2001) sendo que todos *operons* são compostos por genes que codificam proteínas integrais de membrana, permeases ou ATPases.

Entretanto, em fungos, a ocorrência de transportadores ABC envolvidos no transporte do complexo ferro-sideróforos em fungos não foi encontrada na literatura.

Com o resultado obtidos nos alinhamentos das seqüências dos transcritos 15.x, tentou-se ainda, amplificar o gene homólogo ao regulador da biossíntese de sideróforos, a partir do material crescido com ou sem ferro(III) realizando-se reações de PCR *nested* com os *primers* NUP e NGSP2 (Figura 7). O produto da primeira PCR, usado como molde na reação *nested*, foi amplificado com os *primers* UPM e GSP2 (Figura 6, linhas 4 e 5). Na Figura 7A está mostrado o resultado obtido na PCR *nested* para *P. chrysosporium* crescido em meio sem ferro(III) e na Figura 7B a amplificação *nested* observada para *P. chrysosporium* crescido em meio com suprimento de ferro(III).

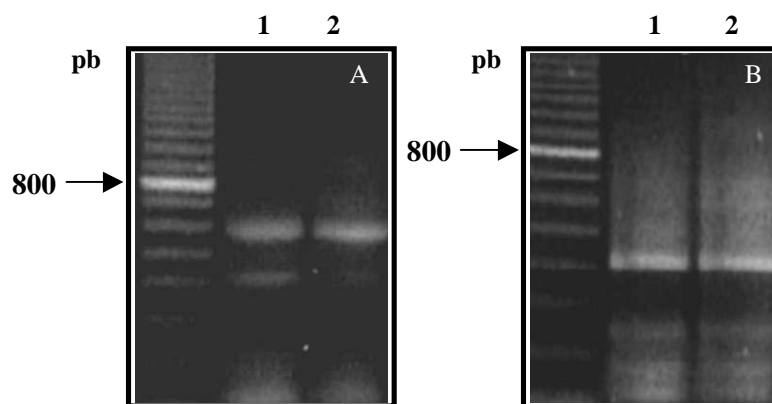


Figura 7. Produto da amplificação *nested*. **A.** *P. chrysosporium* sem ferro(III), *primers* NUP e NGSP2 e **B.** *P. chrysosporium* com ferro(III), *primers* NUP e NGSP2. Linha 1: 1 µl da primeira PCR como molde na reação; e Linha 2: 1 µl da primeira PCR diluída 1/5 como molde na reação. Marcador de peso molecular 100 pb (InvitrogenTM).

Os produtos obtidos na amplificação *nested* com os *primers* **NUP** e **NGSP2** para a condição de crescimento de carência de ferro(III) no meio de cultivo (Figura 7A, linha 2), foram clonados e identificados como 16.x. Os resultados obtidos no alinhamento entre as seqüências obtidas para estes transcritos com seqüências depositadas no GenBank estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Resultados obtidos no alinhamento das seqüências dos fragmentos 16.x, obtidos de amostra crescida em carência de ferro(III) no meio de cultivo.

Fragmento	Tamanho (pb) ^a	Homologias (Número de acesso no GenBank)	Frame	Identidade (%)	Similaridade (%)	Escore, <i>E-value</i>
16.17 e 16.26	400	Proteína hipotética <i>Microbulbifer degradans</i> 2-40 (ZP_00067049)	+1	34	45	30, 6,2
16.18	600	Precursor da lignina peroxidase LiPA <i>P. chrysosporium</i> (CAA38177)	+2	95	95	142, 2e-44
16.21	550	Precursor da lignina peroxidase LiPA <i>P. chrysosporium</i> (CAA38177)	+1	100	100	140, 3e-41
16.24	400	Proteína hipotética <i>Rattus norvegicus</i> (XP_239650)	+2	35	53	34, 0,73

a= tamanho do fragmento estimado com base no marcador de peso molecular 100 pb (InvitrogenTM)

A análise das seqüências no banco de dados permitiu verificar similaridade entre a seqüência de aminoácidos deduzida dos fragmentos 16.17, 16.26 e 16.24 com seqüências de proteínas hipotéticas de diferentes espécies, e uma alta identidade entre os fragmentos 16.18 e 16.21 com inúmeras seqüências diferentes de lignina peroxidases, manganês peroxidases e precursores destas enzimas de *P. chrysosporium* e outras espécies de fungos de degradação branca. A análise de *Northern blotting* foi realizada somente para os fragmentos 16.18 e 16.21, sendo que não foi observada nenhuma hibridização destes transcritos nas membranas com RNA total de *P. chrysosporium*, independentemente da condição de disponibilidade de ferro(III) no meio de cultivo.

Como mostrado na Tabela 4, verificou-se que as seqüências de 16.18 e 16.21 são homólogos à seqüência do precursor da LiPA (lignina peroxidase A) de *P. chrysosporium* com uma identidade de 95% e 100%, respectivamente.

Procedeu-se o alinhamento entre as seqüências nucleicas dos fragmentos 16.18 e 16.21. Com isso, verificou-se que estes fragmentos correspondem a diferentes porções de um mesmo gene, o qual de acordo com o resultado dos alinhamentos das seqüências destes fragmentos no GenBank parece ser o gene *lipA*.

A homologia com precursores de lignina peroxidases foi observada para outro fragmento (1.1) isolado neste estudo, como discutido no Capítulo 2. Este fragmento foi isolado utilizando-se a técnica de *display* diferencial de mRNA a partir de RNA extraído de micélio de *P. chrysosporium* crescido em meio com carência de ferro(III) da mesma forma que os fragmentos 16.18 e 16.21. A seqüência de aminoácidos codificada por 1.1 mostrou homologia com identidade de 94% com o precursor GLG5 da lignina peroxidase (LiP6) de *P. chrysosporium* e teve sua expressão induzida pela carência de ferro no meio, sendo esta expressão diferencial confirmada por *Northern blotting*, o que como citado acima não foi verificado para os fragmentos 16.18 e 16.21, o que pode ter sido devido ao fato destes transcritos terem sido obtidos em reações de PCR com *primers* específicos o que pode ter levado a uma rápida amplificação de cDNAs de baixo número de cópias, que podem não ter sido detectadas pelo método de *Northern blot*.

Como amplamente reportado na literatura, as lignina peroxidases são geralmente secretadas como isoenzimas múltiplas as quais podem ser produzidas a partir de genes múltiplos e/ou por modificações pós-traducionais diferenciais (Conesa *et al.*, 2002). Em *P.*

chrysosporium existem no mínimo dez genes (*lipA-J*) que codificam as lignina peroxidases. Estes genes são estruturalmente similares, cada um com diferentes formas alélicas, e estão agrupados em três grupos de ligação (revisão em Conesa *et al.*, 2002; revisão em Martínez, 2002). Segundo Gaskell *et al.* (1991) o gene *GLG5* está localizado aproximadamente 14 Kb *downstream* do gene *lipB* o qual está imediatamente adjacente (1,3 Kb) ao gene *lipA*, sendo estes dois últimos transcricionalmente convergentes. Stewart & Cullen (1999), obtiveram um mapa físico detalhado da organização genômica de oito genes que codificam para lignina peroxidases, sendo verificado que os genes, *lipA*, *lipB*, *lipC* e *lipE* estavam organizados dentro de uma região de 35 Kb e que os quatro genes restantes (*lipG*, *lipH*, *lipI* e *lipJ*) estavam agrupados em uma região de 15 Kb. Os genes *lipD* e *lipF* não foram mapeados.

Portanto, é possível que os fragmentos 1.1 e 16.21/16.18 isolados correspondam a genes diferentes. Somente a obtenção da sequência completa de cada transcrito permitirá verificar a qual gene *lip* corresponde cada fragmento isolado neste estudo.

Apesar do fato de que estudos reportando o papel do ferro na regulação da expressão dos genes *lip* não tenham sido encontrados na literatura, os resultados obtidos neste estudo permitem sugerir que no mínimo um, e provavelmente mais que um, destes genes devem ter sua expressão regulada por este metal, como foi verificado para o transcrito 1.1, que codifica o precursor da *GLG5*, cuja expressão foi induzida pela carência de ferro(III). Estudos adicionais devem ser feitos para verificar, entre outros, quantos e quais genes *lip* têm a sua expressão ferro-dependente.

Os produtos obtidos na amplificação com os *primers* **NUP** e **NGSP2** para a condição de crescimento de suprimento de ferro(III) no meio de cultivo (Figura 7B, linha 2), foram clonados e identificados como 17.x. Os resultados obtidos no alinhamento das sequências obtidas para estes fragmentos, com sequências depositadas no GenBank estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Resultados obtidos no alinhamento dos fragmentos 17.x, obtidos de amostra crescida com suprimento de ferro(III) no meio de cultivo.

Transcrito	Tamanho (pb) ^a	Homologias (Número de acesso no GenBank)	Frame	Identidade (%)	Similaridade (%)	Escore, <i>E-value</i>
17.6	550	Poliubiquitina 5 <i>Phanerochaete chrysosporium</i> (CAA80851)	-2	86	89	115, 2e-25
17.7	450	Proteína hipotética <i>Prochlorococcus marinus</i> subsp. <i>pastoris</i> (ZP_00105442)	+2	52	60	31, 5,0
17.8 e 17.38	450	Regulador transcricional <i>Mesorhizobium loti</i> (NP_106026)	+1	50	58	30, 8,5
17.39	300	NapG oxidoreductase <i>Streptomyces collinus</i> (AAD31829)	+1	35	43	35, 0,50
17.40	200	s.a.	-	-	-	-
17.62	530	s.a.	-	-	-	-

a= tamanho do fragmento estimado com base no marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen™)

A análise das seqüências no banco de dados permitiu verificar similaridade entre a seqüência de aminoácidos codificada pelo fragmento 17.7 com a seqüência de uma proteína hipotética de *Prochlorococcus marinus* subsp. *pastoris*. A seqüência de aminoácidos codificada pelos fragmentos de mesma seqüência, 17.8 e 17.38, alinharam com um regulador transcricional de *Desulfovibrio desulfuricans* com identidade de 37%. A seqüência de aminoácidos deduzida de 17.39 alinhou com uma oxidoreductase de *Streptomyces collinus* com identidade de 35% e de 17.6 mostrou homologia (86% de identidade) com a poliubiquitina 5 de *P. chrysosporium*.

O alinhamento da seqüência de aminoácidos deduzida para o fragmento 17.6 com seqüências depositadas no GenBank permitiu verificar que esta apresenta homologia com inúmeras seqüências deduzidas de aminoácidos de ubiquitinas das mais diversas espécies. O alinhamento mais significativo foi com a poliubiquitina 5 de *P. chrysosporium* (Escher & Raeder, 1999, não publicado) com 86% de identidade. Esta identidade permite afirmar que o fragmento contido no clone 17.6 é parte do gene da poliubiquitina 5 de *P. chrysosporium*.

A seguir está apresentada a seqüência de aminoácidos da poliubiquitina 5 de *P. chrysosporium*, estando sublinhada a seqüência deduzida para a *ORF* do clone 17.6 e em negrito está assinalada uma seqüência de 76 aminoácidos a qual é repetida em *tandem* nas poliubiquitinas.

1 MQIFVKTLTGKTITLEVESSDTIDNVKAKIQDKEGIPPDQQRLLFAGKQLEDGRTLSDY
61 NIKESTLHLVLRRLRGGMQIFVKTLTGKTITLEVESSDTIDNVKAKIQDKEGIPPDQQRLL
121 FAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRRLRGGMQIFVKTLTGKTITLEVESSDTIDNVKA
181 KIQDKEGIPPDQQRLLFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRRLRGGMQIFVKTLTGKT
241 ITLEVESSDTIDNVKAKIQDKEGIPPDQQRLLFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLR
301 LRGGMQIFVKTLTGKTITLEVESSDTIDNVKAKIQDKEGIPPDQQRLLFAGKQLEDGRTL
361 SDYNIQKESTLHLVLRRLRGG

As ubiquitinas são proteínas pequenas de cerca de 76 aminoácidos que tem papel importante em diversos processos celulares incluindo: controle do ciclo celular, regulação da transcrição, reparo de DNA, tradução de sinal, biogênese de organelas, respostas ao estresse, adaptação metabólica e degradação de proteínas em eucariotos (Ling *et al.*, 2000). As ubiquitinas são codificadas por famílias multigênicas relativamente pequenas, que compreendem uma classe de genes monoméricos e uma classe de genes poliméricos. Os genes monoméricos consistem em 228 nucleotídeos com uma sequência C-terminal adicional que codifica uma proteína ribossomal. Em contraste, os genes poliméricos conhecidos como poliubiquitinas são formadas por repetições em *tandem* de genes de 228 pb (76 aminoácidos), sem nenhuma sequência espaçadora entre eles (Nei *et al.*, 2000).

A análise de *Northern blotting* foi realizada somente para os fragmentos 17.6 e 17.39. Para o fragmento 17.6 a análise por *Northern blotting* permitiu confirmar que a expressão do mesmo é regulada pela presença de ferro(III) no meio de cultura, sendo que a expressão obtida foi de 100%. Como pode-se verificar na Figura 8, o transcrito foi expresso também em cultivo sem suprimento de ferro(III) só que em quantidade bastante menor (16%). Verificou-se ainda, que o fragmento 17.6 corresponde a um transcrito de cerca de 1.720 pb, tamanho este estimado com base no marcador de peso molecular de RNA de 0,16-1,77 Kb (InvitrogenTM).

Para o fragmento 17.39 a expressão regulada por ferro(III) não foi confirmada, não sendo observada a hibridização do mesmo com os RNA totais de *P. chrysosporium* fixados na membrana de *nylon*, independentemente da condição de disponibilidade de ferro(III) no meio de cultivo. Como discutido anteriormente, uma explicação para este resultado poderia ser o fato de que este transcrito pode estar sendo pouco expresso dificultando a detecção da hibridização por *Northern blotting*.

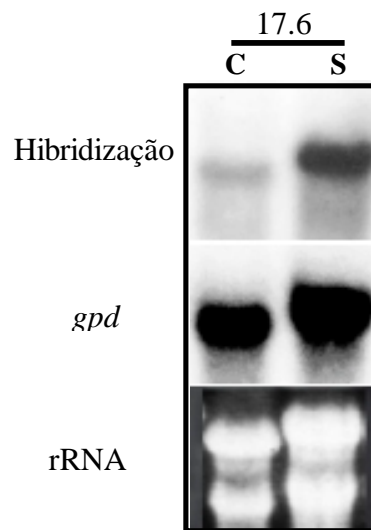


Figura 8. Análise de *Northern blotting* para o fragmento 17.6 isolado de *P. chrysosporium*. Condições de cultivo: C= carência de ferro(III) e S= suprimento de ferro(III) no meio de cultivo. Na figura estão mostrados os resultados da hibridização: do fragmento marcado radiativamente, da sonda *gpd* usada para normalização da quantidade de RNA na membrana; e, gel de agarose 1% com as amostras de RNA total (rRNA).

4. Conclusões

Embora o isolamento do clone 2.3, descrito no Capítulo 3, cuja sequência alinhou com genes que codificam reguladores da biossíntese de sideróforos, tenha permitindo o desenho de *primers* específicos para buscar o isolamento do cDNA de um gene envolvido na regulação da biossíntese de sideróforos em *Phanerochaete chrysosporium*, os fragmentos de transcritos obtidos na presente etapa do estudo não foram homólogos aos genes *sre*, *sreA* e *sreP* já descritos na literatura, os quais codificam fatores de transcrição GATA envolvidos na regulação da síntese de sideróforos, em *N. crassa*, *A. nidulans* e *P. chrysogenum*.

Embora a sequência de aminoácidos deduzida de inúmeros fragmentos isolados nesta etapa do estudo, entre os quais o 6.39 que alinhou com uma carboxilase; o 6.40 que alinhou com uma possível proteína de distribuição vacuolar, o 6.44 que alinhou com o componente E1 da 2-oxoglutarato desidrogenase, o 15.6 (15.12) que alinhou com inúmeras sequências de ATPases, e os transcritos 16.18 e 16.21 que alinharam com o precursor da lignina peroxidase A de *P. chrysosporium*, tenham mostrado forte similaridade com sequências depositadas no GenBank, o único transcrito isolado nesta etapa do trabalho que teve a sua expressão regulada por ferro (III) confirmada foi o 17.6. O alinhamento da sequência de 17.6 com sequências do GenBank permitiu verificar que este fragmento é parte do multigene que codifica a poliubiquitina 5 de *P. chrysosporium*. Este transcrito teve sua expressão aumentada quando o fungo foi cultivado em meio com suprimento de ferro(III) indicando um papel deste metal na regulação da expressão gênica da poliubiquitina 5.

Desta forma, devido aos resultados obtidos nesta etapa do estudo, surgiu a necessidade de se tentar uma nova abordagem para buscar o isolamento do gene que codifica o transcrito 2.3. A abordagem utilizada e os resultados obtidos estão descritos no Capítulo 5, a seguir.

Capítulo 5

Isolamento e caracterização de um gene da família de transportadores do tipo ABC de *P. chrysosporium*

1. Introdução

O mecanismo mais comum de transporte de substratos, em bactérias, é o sistema ABC. Estes transportadores dependentes de ATP, designados de transportadores ABC, transportadores ATP cassetes ou ATPases, são responsáveis pela absorção de aminoácidos, peptídeos, açúcares, vitaminas, cátions e ânions inorgânicos, ferro, sideróforos complexados com Fe(III) e grupos heme ligados a proteínas, além de, exportar certas proteínas, polissacarídeos e compostos tóxicos (Braun & Killmann, 1999).

O sistema ABC inclui uma gama extremamente diversa de proteínas de transporte de membrana que requerem a energia resultante da hidrólise de ATP para a translocação de solutos através da membrana (Schneider & Hunke, 1998). Os transportadores ABC em geral possuem uma estrutura comum que é formada por quatro domínios que podem estar em polipeptídeos separados ou podem estar fusionados em uma variedade de configurações, como esquematizado na Figura 1. Dois destes domínios/subunidades são integrais da membrana sendo que cada um atravessa a membrana seis vezes. Os outros dois domínios/subunidades são capazes de hidrolisar ATP e acoplar a energia gerada ao movimento de importação (Schneider & Hunke, 1998; Dugourd *et al.*, 1999).

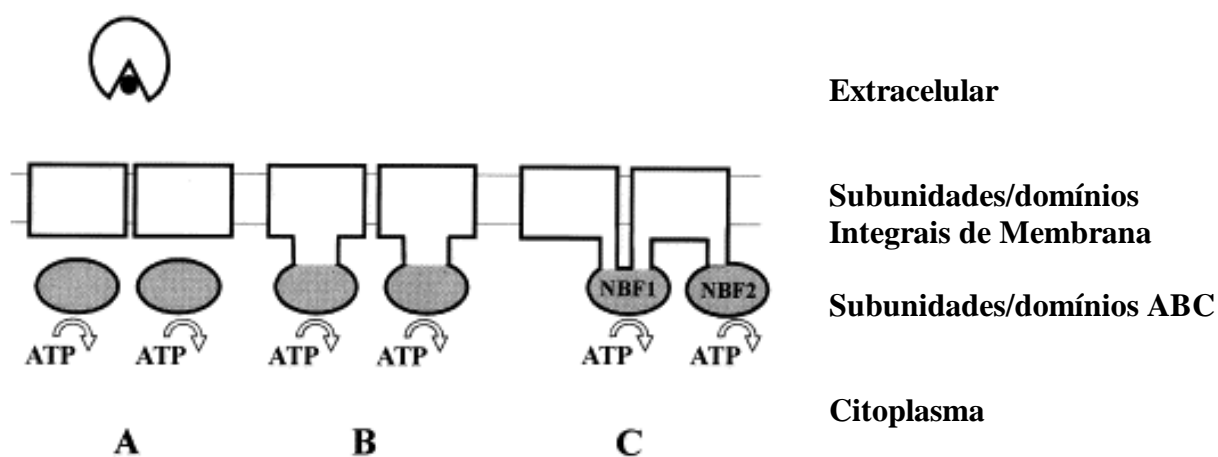


Figura 1. Representação esquemática de três domínios estruturais de transportadores ABC. Onde NBF (*Nucleotide Binding Fold*). Reproduzida de Schneider & Hunke (1998).

A estrutura característica destas proteínas consiste de um conjunto de domínios transmembrana (TMD) e domínios de ligação à nucleotídeos (NBD, *Nucleotide Binding Domain* ou NBF, *Nucleotide Binding Fold*), sendo que a maioria das proteínas ABC possui dois domínios transmembrana e dois NBDs (Schneider & Hunke, 1998; Epping & Moye-Rowley, 2002). As regiões NBD dos transportadores ABC são similares em uma faixa de cerca de 200 aminoácidos (Katzmann *et al.*, 1995). Esta faixa contém um motivo de ligação ao ATP (*ATP-binding*) altamente conservado que consiste de dois sítios (A e B) que formam uma bolsa de ligação ao ATP, também chamado de motivo Walker (Dugourd *et al.*, 1999). Entretanto, foi verificado que o número de aminoácidos entre os domínios funcionais é bastante variável, sendo que as proteínas ABC são classificadas em sub-famílias com base na similaridade das seqüências entre os NBS e no espaçamento entre estes (Katzmann *et al.*, 1995; Epping & Moye-Rowley, 2002). Duas destas sub-famílias são as mais estudadas. Uma compreende as proteínas de resistência à multidrogas (MRP, *Multidrug Resistance Proteins*) as quais são superexpressas em tumores, sendo que a maioria dos transportadores ABC pertencem à esta sub-família. Uma segunda classe destes transportadores, bastante estudada, é composta pelo regulador da condutividade transmembrana na fibrose cística de humanos (CFTR) que quando mutado resulta na fibrose cística.

O envolvimento do sistema de proteínas transportadoras ABC na captação de ferro tem sido descrito para várias espécies de bactérias. Em *Escherichia coli*, o transporte de ferro via ferricromo é realizado por um grupo de transportadores ATP-dependentes, sendo o transporte através da membrana citoplasmática mediado por três proteínas: FhuD no periplasma, FhuB na membrana citoplasmática e FhuC (ATPase) associada com a parte interna da membrana citoplasmática (Mademidis *et al.*, 1997; Groeger & Köster, 1998; Katoh *et al.*, 2001).

Em *Yersinia pestis* foram isolados os genes *ybtP* e *ybtQ* que codificam proteínas que são membros putativos da família de transportadores ABC. Segundo, Fetherston *et al.* (1999), YbtP e YbtQ são estruturalmente únicos dentro da sub-família de transportadores ABC associados com o transporte de ferro, pois possuem um domínio amino-terminal *membrane-spanning* e uma ATPase carboxi-terminal. Ainda, em *Y. pestis* foi isolado o operon *yfeABCD* (Bearden *et al.*, 1998) e o operon *yfuABC* (Gong *et al.*, 2001). O operon *yfeABCD* é regulado por Fur respondendo a concentração de ferro e de manganês e codifica polipeptídeos que apresentam forte similaridade a proteínas do sistema de transportadores ABC e incluem uma

proteína de ligação periplasmática (YfeA), uma proteína que se liga a ATP (YfeB) e duas proteínas integrais de membrana (YfeC e YfeD) as quais provavelmente atuam na aquisição de ferro inorgânico e possivelmente outros íons. O *operon yfuABC* codifica as proteínas YfuABC que apresentam alta homologia com as proteínas transportadoras de ferro de *Y. enterocolitica* e *Serratia marcescens*.

Vários outros *operons* que codificam proteínas da família de transportadores ABC envolvidas no sistema de transporte de ferro de diferentes espécies de bactérias, foram estudados. Entre os *operons* descritos estão o *sfuABC* de *Serratia marcescens* (Angerer *et al.*, 1992), o *cbrABCD* de *Erwinia chrysanthemi* (Mahe *et al.*, 1995), o *sirABC* de *S. aureus* (Horsburgh *et al.*, 2001), o *sitABCD* de *Salmonella typhimurium* (Zhou *et al.*, 1999), o *viuPDGC* de *Vibrio cholerae* (Wickoff *et al.*, 1999) e o *sstABCD* de *Staphylococcus aureus* (Morrissey *et al.*, 2000).

Em fungos, poucos estudos foram realizados para elucidar o papel das proteínas transportadoras da família ABC. Uma possível explicação para isso é que as membranas citoplasmáticas de fungos são mais complexas que as de bactérias onde os estudos de transporte têm avançado consideravelmente (Huschka & Winkelmann, 1989).

Em *S. cerevisiae* foram encontrados 30 genes ABC diferentes, sendo que algumas das proteínas codificadas por eles participam de um sistema de resistência pleiotrópica a drogas análogo ao de resistência a drogas múltiplas (MDR) de mamíferos (Wolfger *et al.*, 2001). Ainda, em *A. nidulans*, *Penicillium digitatum* e *Candida albicans* o envolvimento de transportadores ABC na resistência a drogas foi reportado. Em fungos fitopatogênicos foi sugerido o envolvimento de transportadores ABC na patogenicidade e na própria biologia do fungo (De Waard, 1997). O fungo *Mycosphaerella graminicola*, um patógeno de trigo, produz transportadores ABC específicos que reduzem o acúmulo de toxinas fungicidas, produzidas pelo trigo, no micélio favorecendo a sua colonização (Zwiers & De Waard, 2000).

Neste capítulo será descrito o isolamento de um gene de *P. chrysosporium* que codifica uma proteína da família de transportadores do tipo ABC através de um mini-banco contendo fragmentos de DNA genômico de 2.000 a 3.000 pb digeridos com a enzima *Pvu* II. Este banco foi gerado com base nos resultados obtidos com a hibridização do fragmento 2.3 em *Southern blottings*. Este fragmento de cDNA, cujo isolamento está descrito no Capítulo 3, mostrou homologia com proteínas da família GATA de fatores de transcrição envolvidos na regulação da

biossíntese de sideróforos de diferentes espécies de fungos. Assim, a construção do mini-banco foi uma estratégia alternativa escolhida para se isolar a sequência genômica de homólogos aos fatores de transcrição GATA envolvidos na regulação da expressão de genes dependente de ferro no fungo em estudo.

2. Materiais e Métodos

Para a execução dos experimentos descritos neste capítulo, micélio de *Phanerochaete chrysosporium* foi cultivado em condições diferenciais de ferro(III) como descrito no Capítulo 3, item 2.1.

2.1 Construção de um mini-banco com DNA de *P. chrysosporium*

2.1.1 Extração de DNA

Dada a necessidade de uma grande quantidade de DNA para obtenção de membranas por *Southern blotting*, um novo protocolo de extração de DNA foi padronizado e utilizado.

A nova metodologia de extração do DNA foi baseada no método 5 descrito por Van Burik *et al.* (1998) que testou métodos diferentes de extração de DNA para fungos e, no manual do Laboratório de Genética Molecular Aplicada do CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo) (Hoisington, 1993). Desta forma, cerca de 500 mg de micélio foram macerados em presença de nitrogênio líquido. Ao micélio macerado acrescentou-se 9 mL de tampão de extração (1% CTAB; 1,4 M NaCl; 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 20 mM EDTA), sendo a mistura incubada por 2 h em gelo. Após o período de incubação acrescentou-se 5 mL de fenol (pH 8,0-8,3):clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1, v/v/v), seguido de centrifugação. Repetiu-se a extração com fenol e se procedeu uma extração com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v). O sobrenadante foi precipitado com 0,1 volume de acetato de amônio 7,5 M e 2 volumes de etanol absoluto gelado. Inverteu-se cuidadosamente até que se observou a formação em um enovelado o qual foi recuperado. O DNA foi lavado com etanol 70% e secado à temperatura ambiente. O DNA foi ressuspendido em cerca de 1 mL de TE 1X e incubado com 500 µg/mL de RNase A por 1 h a 37°C.

2.1.2 Southern blotting

Para a obtenção de membranas de nylon por *Southern blotting*, foram feitas reações de digestão DNA do genômico de *P. chrysosporium* distintas utilizando-se as enzimas de restrição *Nco* I, *Pst* I, *Bgl* II, *Pvu* II, *Kpn* I ou *Xba* I (InvitrogenTM).

Cada reação foi constituída de cerca de 10 µg de DNA, 30 U da enzima, tampão da

enzima (1X) fornecido pelo fabricante, e água desionizada para um volume final de 250 µL. A mistura foi incubada a 37°C durante a noite. Em seguida, as amostras foram precipitadas com 0,1 volume de acetato de sódio e 2,5 volumes de etanol absoluto, durante a noite. Após centrifugação os *pellets* de DNA foram ressuspensos em TE 1X, sendo as amostras aplicadas em gel de agarose 0,8% e corridas em TBE 1X, 30 V por cerca de 19 h.

Após a corrida, o gel foi lavado sob leve agitação por 10 minutos com 0,25 N HCl, lavado rapidamente com água destilada, e mantido em agitação na solução de 0,4 N NaOH e 1 M NaCl por 30 min. Em seguida, foi colocado no aparato de transferência utilizando 0,4 N NaOH e 1 M NaCl como solução de transferência. Sobre o gel foi colocada a membrana Hybond-N⁺ (Amersham Biosciences). A transferência foi realizada durante a noite. Após este período, a membrana foi lavada por 30 min em uma solução 100 mM de tampão fosfato pH 7,2. Para fixar o DNA, a membrana foi deixada à temperatura ambiente por cerca de 30 min, seguida de incubação a 80°C por 2 h.

2.1.3 Hibridização

O fragmento 2.3 foi marcado radiativamente e hibridizado com as membranas obtidas contendo o DNA digerido com diferentes enzimas de restrição.

A marcação foi realizada por reação de *random priming* utilizando-se o sistema de marcação “RadPrime DNA Labeling” (InvitrogenTM) juntamente com [α -³²P]dCTP (Amersham Biosciences), seguindo os procedimentos fornecidos pelo fabricante. Os fragmentos 2.3 usados na marcação foram liberados dos plasmídios que os continham após digestão com *EcoR* I e purificação em gel de agarose 1,5% com tampão TAE 1X (1X TAE = 40 mM Trizma; 1 mM EDTA pH 8,0), utilizando-se o “In ConcertTM Rapid Gel Extraction System Kit” (InvitrogenTM), seguindo-se os procedimentos fornecidos pelo fabricante.

Para hibridização foi utilizada incubação a 42°C durante a noite com a solução de pré-hibridização contendo: 50% formamida; 5X SSC (1X SSC = 0,15 M NaCl, 15 mM de citrato de sódio); 10X solução de Denhardt’s (1X = 0,02 % PVP, 0,02% Ficoll 400 e 0,02% BSA); 40 mM Tris-HCl pH 7,5; 1% SDS e 100 µg/mL de DNA de esperma de salmão (ssDNA) desnaturado. Após este período a solução inicial foi retirada e substituída pela solução de hibridização constituída de: 50% formamida; 2X SSC; 40 mM Tris-HCl pH 7,5; 1% SDS; 5%

de sulfato de dextran; 100 µg/mL de DNA de esperma de salmão, acrescida da sonda marcada radiativamente. A hibridização foi realizada durante a noite a 42°C sob rotação a 40 rpm.

A membrana hibridizada foi lavada à temperatura ambiente por 15 minutos em uma solução 2X SSC e 0,1% SDS e em seguida na solução 2X SSC e 0,1% SDS a 50°C por 15 minutos. Após as lavagens, as membranas foram expostas a filme de raio-X (Kodak X-OMAT AR ou HyperfilmTM MP, Amersham Biosciences) com intensificador de sinal (Intensifying Screen, Dupont Cronex) a – 80°C.

2.1.4 Digestão do DNA de *P. chrysosporium* para clonagem no mini-banco

Após avaliação dos resultados de hibridização de 2.3 com DNA digerido com diferentes enzimas de restrição, optou-se por utilizar fragmentos genômicos digeridos com a enzima *Pvu* II para a construção de um mini-banco. Esta escolha se baseou no fato de que a digestão com esta enzima origina fragmentos com extremidades abruptas (*blunt*) não sendo necessária a realização da reação de *blunting*, ou seja, de preenchimento das extremidades dos fragmentos digeridos e também no fato de que o tamanho do fragmento reconhecido pela sequência 2.3 permitiria a clonagem usando plasmídeo como vetor, não sendo necessário o uso de vetores mais complexos.

Desta forma, uma nova digestão de DNA utilizando a enzima *Pvu* II foi feita como descrito no item 2.1.2, neste capítulo. O DNA digerido foi purificado de gel de agarose 0,8% e tampão TBE 1X, do qual cortou-se uma região que continha fragmentos com tamanhos variando entre 2.000 pb a 3.000 pb. Os fragmentos foram purificados utilizando-se o “In ConcertTM Rapid Gel Extraction System Kit” (InvitrogenTM).

2.1.5 Clonagem no vetor pUC18

Os fragmentos de DNA obtidos na purificação foram clonados no vetor pUC18 pelo sistema “Ready-To-GoTM pUC18 *Sma* I/BAP + ligase” (Amersham Biosciences).

Para tanto, ao DNA purificado acrescentou-se H₂O desionizada para um volume final de 20 µL e uma concentração final de 1-2 µg de DNA. Adicionou-se o DNA a um tubo contendo a reação “Ready-To-GoTM pUC18 *Sma* I/BAP + ligase”. A mistura foi incubada por 5 min à temperatura ambiente e, em seguida, por 1 h e 30 min a 16°C.

Para a transformação adicionou-se toda a mistura de ligação a 100 μ L de células competentes DH5 α , permanecendo por cerca de 30 min em banho de gelo. Após este período, foi dado um choque térmico a 42°C por 50 s, seguido pela incubação em gelo por 3 min e pela adição de 0,9 mL de meio LB. O material foi mantido sob agitação a 37°C por 1 h. Alíquotas da transformação foram espalhadas em placas contendo meio LB-ágar com ampicilina (50 μ g/mL) e X-Gal (20mg/mL), seguida de incubação em estufa a 37°C durante a noite. Toda a transformação foi plaqueada para se obter o maior número de colônias “recombinantes” plotadas em membranas de *nylon* pelo método de *Colony blotting* (Lehrach *et al.*, 1990).

2.1.6 Colony blotting

Cada uma das colônias “recombinantes” foi inoculada em 200 μ L de meio LB contendo 50 μ g/mL de ampicilina. Para tanto, foram utilizadas placas de cultivo *96-well*. As bactérias foram crescidas por 24 h a 37°C, sob agitação (110 rpm). Em cada placa de cultivo foi também inoculada uma colônia recombinante contendo o plasmídio com o fragmento 2.3 como controle positivo.

Após o período de cultivo, as bactérias foram transferidas para membranas de *nylon* colocadas sobre meio LB ágar com 50 μ g/mL de ampicilina, com auxílio de um replicador de 96 pinos (Replica Plate, Sigma). As membranas com as bactérias foram incubadas a 37°C por 12-14 h.

Decorrido o período de crescimento, procedeu-se o tratamento das membranas para fixação do DNA. Inicialmente cada membrana foi colocada sobre papel Whatman 3MM embebido na solução de desnaturação (0,5 M NaCl e 1,5 M NaOH) por 4 min à temperatura ambiente. Este passo foi repetido novamente sobre um banho de água fervente. Em seguida, a membrana foi passada para papel Whatman 3MM embebido na solução de neutralização (1 M Tris-HCl pH 7,5 e 1,5 M NaCl) sendo incubada por mais de 5 min à temperatura ambiente. Por fim, a membrana foi incubada a 37°C por 30 min na solução de processamento (50 mM Tris-HCl pH 8,5, 50 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% Na-sarcosil, 0,25 mg/mL proteinase K) pré-aquecida. A fixação do DNA foi realizada em estufa a 80°C por 2 h.

As bactérias crescidas nas placas *96-well* foram estocadas a – 80°C após o acréscimo do meio de cultivo permanente HMFM 1X (*Hogness Modified Freezing Medium*).

2.1.7 Screening do mini-banco com a sonda 2.3

Para identificar os fragmentos de DNA clonados no mini-banco que apresentavam homologia com o fragmento 2.3, realizou-se a hibridização do fragmento marcado radiativamente com as membranas obtidas por *Colony blotting*.

Para tanto, as membranas foram incubadas a 65°C por no mínimo 2 h com a solução de pré-hibridização Church's contendo: 0,5 M NaHPO₄ pH 7,2; 7% SDS, 1 mM EDTA e 100 µg/mL de DNA de esperma de salmão desnaturado. Após este período, a solução inicial foi substituída pela solução de hibridização constituída de: 0,5 M NaHPO₄ pH 7,2; 7% SDS e 1mM EDTA, juntamente com a sonda marcada radiativamente. A hibridização foi realizada durante a noite a 65°C. A marcação da sonda 2.3 foi realizada por reação de *random priming* como descrito acima (item 2.1.3).

As membranas hibridizadas foram lavadas à temperatura ambiente por 25 min em uma solução 2X SSC e 0,1% SDS, em seguida foram lavadas novamente na solução 2X SSC e 0,1% SDS a 55°C por 25 min, e então lavadas na mesma solução a 60°C por 15 min. As membranas foram expostas a filme de raio-X a -80°C.

Os plasmídios das colônias que mostraram um sinal de hibridização com 2.3 mais intenso que o *background* observado para a maioria das colônias foram selecionados para extração. Os procedimentos da mini-preparação foram os mesmos que os descritos no Capítulo 3, item 2.3.6. Os plasmídios obtidos foram digeridos com as enzimas *BamH* I e *Kpn* I para a verificação do tamanho do inserto. A reação de digestão foi constituída da mistura de: 5 µL do plasmídio, 5 U de cada enzima, tampão das enzimas 1X (20 mM Tris-HCl pH 7,4; 5 mM MgCl₂ e 50 mM KCl) e água desionizada para um volume final de 30 µL. A reação foi realizada incubando-se a mistura a 37°C por 4 h. O resultado foi verificado em gel de agarose 1%, TBE 1X, 80 V.

Os fragmentos de DNA obtidos cujos tamanhos variavam entre 2.000 a 3.000 pb foram sequenciados. Os procedimentos utilizados estão descritos no item 2.3.7, Capítulo 3.

As seqüências obtidas foram alinhadas com seqüências contidas no GenBank usando-se os programas BLASTN 2.1.2 e BLASTX 2.2.1 (Altschul *et al.*, 1997).

2.2 Isolamento da sequência completa do gene P14A1

2.2.1 Obtenção da sequência completa do inserto do clone P14A1

Um dos fragmentos isolados a partir do mini-banco foi o P14A1 o qual foi sequenciado inicialmente com os *primers* -40 M13 *foward* e 28 M13 *reverse* homólogos à sequência do vetor pUC18. Para obter a sequência completa deste fragmento, foram desenhados *primers* internos (Tabela 1) com base nas sequências que eram obtidas à medida que um novo segmento era sequenciado.

Tabela 1. Sequências dos *primers* sintetizados para o sequenciamento completo do fragmento P14A1.

Primer	Sequência 5'→3'	Sentido
P14A1D	CACTTGGACCGCATTGACACGTAC	Direto
P14A1R	TTGAATAGTGCACGCCCGACG	Reverso
P14A1Dint3	TCAAGGTTATTTCAGGTCGCCGCTC	Direto
P14A1Rint1	GTCTGCCAAACGAAACAT	Reverso
P14A1Rint2	TGTCGCATTCTGGATCCACGCC	Reverso

2.2.2 Síntese de cDNA para a obtenção da sequência completa do cDNA ABC de *P. chrysosporium*.

Após a obtenção da sequência do fragmento P14A1 partiu-se para o sequenciamento completo do transcrito do gene ABC de *P. chrysosporium*. Para tanto, procedeu-se a síntese de cDNA 3' RACE e 5' RACE pelo método SMARTTM RACE cDNA Amplification (Clontech). Ainda, foram desenhados diferentes conjuntos de *primers* com base na sequência genômica deste gene depositada no banco de dados do **White Rot Genome Project**, desenvolvido pelo DOE Joint Genome Institute, operado pela Universidade da Califórnia para o Departamento de Energia dos Estados Unidos, o qual tem por objetivo o sequenciamento completo do genoma de *P. chrysosporium*. Uma vez que estimou-se através do programa GENSCAN v 1.0 (Burge & Karlin, 1997; Burge & Karlin, 1998) que o transcrito completo deveria possuir cerca de 3.650 pb distribuídos em 18 *exons*, optou-se por utilizar diferentes conjuntos de *primers* para se obter fragmentos parciais do transcrito ABC contendo diferentes porções do transcrito completo facilitando assim o sequenciamento.

Para síntese de cDNA, inicialmente cerca de 10 µg de RNA total de cada condição de crescimento foi tratado com DNase I, para eliminação de qualquer contaminação de DNA genômico, através da adição de: 4 U de *Human Placental RNase Inhibitor*; 1,5 mM de MgCl₂; 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM KCl; 10 U de DNase I *amplification grade* (InvitrogenTM). A reação com volume final de 100 µL foi incubada por 1 h a 37°C. Após o período de incubação, foi realizada a extração com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1, v/v/v). O RNA total livre de DNA foi precipitado através da adição de 0,1 volume de acetato de sódio 3 M e um volume de etanol absoluto gelado, e após foi estocado em freezer a - 80°C. A qualidade do RNA tratado obtido foi verificada em gel desnaturante de agarose 1% com MOPS 1X e formaldeído 1,8%.

Procedeu-se a síntese de cDNAs completos 3' RACE e 5' RACE, para as condições diferenciais de crescimento do micélio. O mesmo procedimento descrito no Capítulo 4, item 2.1 foi utilizado para a síntese de cDNAs 5' RACE. Para a síntese de cDNA pelo sistema 3' RACE, 1 µg de RNA total e 1 µL do *primer* 3'-CDs foram misturados com água deionizada para um volume final de 5 µL. Como para a síntese de cDNA pelo sistema 5' RACE, a mistura foi homogeneizada e incubada por 2 min a 70°C, e logo mantida no gelo por 2 min. Em seguida, acrescentou-se à reação anterior 5 µL da mistura: 2 µL do tampão 5X *first Strand*, 1 µL de DTT 20 mM, 1 µL da mistura de dNTPs 10 mM e 200 U de SuperScript II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (InvitrogenTM). Incubou-se a reação a 42°C por 1 h e 30 min e após este período acrescentou-se 100 µL de Tricine-EDTA. A reação foi, ainda, incubada por 7 min a 72°C, aliquoteada e, estocada a - 20°C.

2.2.3 Reações de PCR

As reações de amplificação para obtenção de fragmentos parciais do transcrito que codifica a proteína ABC de *P. chrysosporium* foram constituídas da mistura: 1-3 µL de cDNA (3' RACE ou 5' RACE), ou ainda de 200-500 ng de DNA, 2 µL do *primer sense* (20 pmol/µL), 2 µL do *primer anti-sense* (20 pmol/µL), 5 µL da mistura de dNTPs 2 mM, 5 µL do tampão de amplificação 10X, 2,5 U de *Taq* DNA Polimerase (Amersham Biosciences) e H₂O desionizada para um volume final de 50 µL. Para a amplificação foram usados os ciclos: 1 ciclo de 94°C (5 min), 65°C (5 min) e 72°C (20 min), seguido de 40 ciclos de 94°C (1 min),

65°C (1 min e 30 s) e 72°C (5 min), com extensão final de 72°C (20 min). O DNA foi utilizado como controle para verificar o tamanho do produto amplificado. As seqüências dos *primers* utilizados estão mostradas na Tabela 2.

Tabela 2. Seqüência dos *primers* usados para obter fragmentos parciais do transcrito ABC de *P. chrysosporium*.

Nome do <i>primer</i>	Seqüência 5' → 3'
Exon1fow1	ATGGCCAACAGCGAGGTGAA
DABCrev1	GCTGAGACACGCTGGCTGCTACCG
DABCfow1	CGGTAGCAGCCAGCGTGTCTCAGC
RABCrev1	AAGTGAAGGGCGTGGGTGACAAGGATAA
RABCfow1	CCACGCCCTTCACTTCCTCTCACAA
ABCrev6	ATCGGTGTAATACTCGTTGTCATGCA
RABCfow3	GTCGAGGCGGAGGAAGCGGCTAT
Exon18rev3	CTAAACATCTTGTGCCCGAA

Os produtos das PCRs foram clonados utilizando-se o pGEM®-T Easy Vector System (Promega) como descrito no Capítulo 3, item 2.3.5 e sequenciados. As reações de sequenciamento foram feitas utilizando-se o sistema “Thermo Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing Kit” (Amersham Biosciences), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante, utilizando-se cerca de 400 ng de DNA plasmidial. Os ciclos de amplificação foram: 40 ciclos de 95°C (30 s), 60-65°C (30 s) e 72°C (1 min), a reação foi terminada adicionando-se 4 µL da solução constituída de: formamida 95%; 20mM EDTA; azul de bromofenol 0,05%; xileno cianol 0,05%, fornecido pelo fabricante. As seqüências dos *primers* (*sense* ou *antisense*) utilizados nas reações de sequenciamento estão mostrados na Tabela 3.

As amostras foram corridas em gel de poliacrilamida 6,5%, a 2000 V, 50 mA e 50 W. Após decorrido o tempo de migração, o gel foi transferido para uma folha de papel Whatman 3MM e colocado em um secador de vácuo (Hoefer® Drygel Sr.) a 80°C, por uma hora. Em seguida foi exposto a um filme de raio-X (Kodak X-OMAT AR ou Hyperfilm™ MP, Amersham Biosciences).

Tabela 3. Sequência dos *primers* internos usados no sequenciamento dos fragmentos parciais clonados do transcrito ABC.

Nome do <i>primer</i>	Sequência 5' → 3'
M13 <i>foward</i>	GTAAAACGACGGCCAGT
M13 <i>reverse</i>	CAGGAAACAGCTATGAC
ABCfow1	CCTGCTGTCCATGCTCACGT
ABCfow2	CGGTCTGCCTAGTCATCTTGCT
ABCfow3	CCGCACTCGTCCGCCTT
Exon6rev1	GGTCCATAAGCGGGGCCT
P14A1Rint2	TGTCGCATTCTGGATCCACGCC
ABCrev3	CATCTTCCACCGCCTTCCA
ABCfow4	TATGGACGAGATGGGAGCCTA
ABCrev4	GAAAGCCGCGAAGTATTGGT
ABCfow4b	CATTCGCCTGGACTTCCT
ABCfow5	AACAAACCCCCTGCGGAGT
ABCrev5	TAACCAATGCACGCGCCA

As sequências obtidas com os diferentes *primers* foram alinhadas com a sequência do gene com o auxílio do programa MultAlin v. 5.4.1 (Corpet, 1988). A sequência do gene ABC de *P. chrysosporium* foi obtida a partir do banco de dados do **White Rot Genome Project**, desenvolvido pelo DOE Joint Genome Institute, disponível na Internet ([http://www.jgi.doe.gov/ programs/whiterot.htm](http://www.jgi.doe.gov/programs/whiterot.htm)).

3. Resultados e discussão

3.1 Construção de um mini-banco com DNA de *P. chrysosporium*

3.1.1 Southern blotting

Para a construção do mini-banco, inicialmente o fragmento 2.3 foi usado como sonda marcada radiativamente para hibridização com membranas de *nylon* contendo DNA de *P. chrysosporium* digerido com as enzimas de restrição *Nco* I, *Pst* I, *Bgl* II, *Pvu* II, *Kpn* I ou *Xba* I (InvitrogenTM).

Com isso, verificou-se a hibridização de 2.3 com três fragmentos de DNA digerido com *Nco* I, um de 100 pb (sinal fraco), outro de 650 pb e o terceiro com 5.000 pb e com um único fragmento de cerca de 2.900 pb quando o DNA foi digerido com a enzima *Pst* I, como mostrado na Figura 2A e 2B. Para o DNA digerido com a enzima *Bgl* II foi observada a hibridização da sonda 2.3 com dois fragmentos, um com cerca de 8.500 pb e outro com aproximadamente 12.000 pb. Quando o DNA foi digerido com a enzima *Pvu* II, verificou-se a hibridização da sonda com um fragmento de cerca de 2.600 pb. O resultado da hibridização de 2.3 com o DNA digerido com as enzimas de restrição *Bgl* II e *Pvu* II está mostrado na Figura 2C e 2D.

Já para o DNA digerido com as enzimas *Kpn* I e *Xba* I não foi observada hibridização com 2.3 (não mostrado). Isto pode ter sido devido ao fato de que estas enzimas são enzimas de sítios raros, ou seja, enzimas que normalmente reconhecem poucos sítios de corte no DNA em geral, o que parece ter ocorrido uma vez que foi verificado um acúmulo de fragmentos de DNA próximo ao ponto de aplicação das amostras no gel.

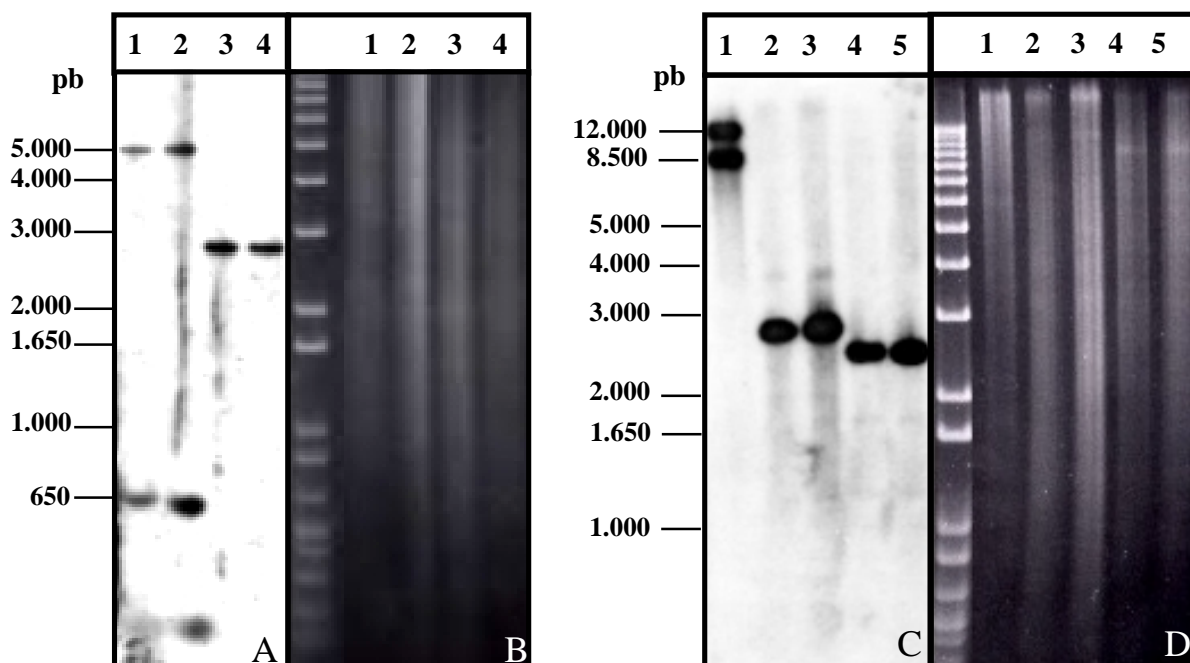


Figura 2. Hibridização com a sonda 2.3. **A e B.** Autoradiografia em filme de raio-X e gel de agarose 0,8% com digestões do DNA genômico de *P. chrysosporium* com enzimas de restrição, respectivamente. Linhas 1 e 2: *Nco* I e Linhas 3 e 4: *Pst* I; **C e D.** Autoradiografia em filme de raio-X e gel de agarose 0,8% com digestões do DNA genômico com enzimas de restrição, respectivamente. Linha 1: *Bgl* II, Linhas 2 e 3: *Pst* I e Linhas 4 e 5: *Pvu* II. Marcador de peso molecular 1 Kb Plus (InvitrogenTM).

3.1.2 Colony blotting

Com os resultados obtidos na hibridização por *Southern blotting* do fragmento 2.3, optou-se por clonar fragmentos de DNA genômico digeridos com a enzima de restrição *Pvu* II na construção do mini-banco. Esta decisão baseou-se no fato de que a digestão com esta enzima de restrição produz fragmentos com extremidades abruptas e também gera um único fragmento de um tamanho (2.600 pb) que permite obter uma clonagem eficiente. Para tanto, fragmentos de DNA genômico digeridos com *Pvu* II e com tamanhos variando de 2.000 a 3.000 pb foram purificados de gel e clonados. Com este procedimento, foram obtidos cerca de 2.900 clones “recombinantes” que foram inoculados em placas de cultivo 96-well contendo meio líquido LB e plotados em membranas de *nylon*.

Trinta e uma membranas foram obtidas e foram hibridizadas com a sonda 2.3, permitindo o isolamento de 38 clones com sinal mais forte em relação ao *background* observado para as colônias restantes. Como exemplo dos resultados obtidos, na Figura 3 está mostrada a hibridização da sonda com a membrana M3, que permitiu o isolamento do clone M3A2.

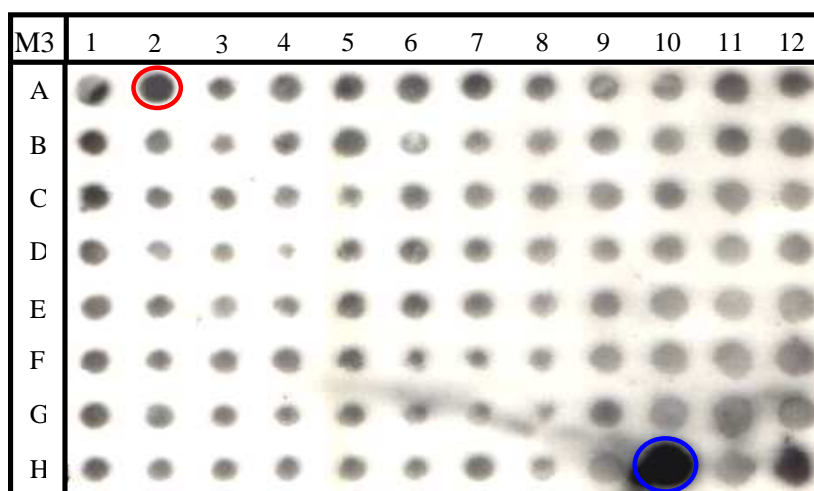


Figura 3. Autoradiografia em filme de raio-X da membrana M3 hibridizada com a sonda 2.3. Círculo vermelho= hibridização com o fragmento M3A2 e Círculo azul= hibridização controle (clone com fragmento 2.3).

Os fragmentos inseridos nos 38 clones isolados foram liberados por digestão com as enzimas *Bam*H I e *Kpn* I para verificação do tamanho do inserto. Destes, os que apresentaram tamanho entre 2.000 e 3.000 pb foram seqüenciados no sentido direto e no sentido reverso. As seqüências obtidas para 18 fragmentos foram alinhadas com seqüências depositadas no GenBank utilizado-se o programa BLASTX 2.2.1 (Altschul *et al.*, 1997), sendo que os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4. Ainda, na Tabela 4 estão mostrados os resultados obtidos com o alinhamento das seqüências obtidas com a seqüência genômica de *P. chrysosporium* obtida pelo **White Rot Genome Project**, ou seja, o *Scaffold* com o qual cada seqüência obtida alinhou. O grupo que desenvolve o projeto genoma do fungo disponibilizou o alinhamento, pelo programa BLAST, com as seqüências que estão sendo obtidas, as quais estão organizadas no banco de dados na forma de *Scaffolds*, semelhantes a *contigs*.

Para as seqüências que alinharam com seqüências protéicas de interesse, procedeu-se um alinhamento no programa CLUSTALW (1.81) entre a seqüência de nucleotídeos do gene

de interesse e a sequência de bases do fragmento de DNA genômico clonado no mini-banco.

Tabela 4. Resultados do alinhamento no GenBank das sequências dos fragmentos isolados a partir do mini-banco.

Fragmento	Sentido de leitura	Número de bases lidas	Alinhamentos de interesse	Alinhamento Scaffold ^a
M1E5	Direto	425	-	33
M2A7	Direto	378	-	21
M2H2	Direto	300	-	32
M3A1	Direto	414	-	24
M3A2	Direto	373	Precursor do receptor da aerobactina IutA de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	16
M4C5	Direto	360	-	128
M5A7	Direto	382	-	15
M5H1	Direto	413	-	32
M5H2	Direto	332	-	1
M6A2	Direto	333	-	78
M7D5	Direto	384	-	93
M10A1	Direto	367	-	74
P11C1	Direto	395	-	216
P14A1	Direto	409	Proteína transportadora ABC (YOR1) de <i>N. crassa</i> Proteína transportadora ABC de <i>Arabidopsis thaliana</i> Transportador glutatona-conjugado AtMRP4 de <i>A. thaliana</i> Transportador ABC de resistência múltipla de <i>Oryza sativa</i> Transportador ABC de <i>Schizosaccharomyces pombe</i> , etc.	2
P15G12	Direto	331	-	14
P21D2	Direto	171	-	9
P24A1	Direto	421	-	3
P31E3	Direto	348	Proteína lucA de <i>Halobacterium</i> sp. NRC-1	3
M1E5R	Reverso	367	-	s.a.
M2A7R	Reverso	335	-	21
M2H2R	Reverso	390	-	32
M3A1R	Reverso	324	-	24
M3A2R	Reverso	206	-	16
M4C5R	Reverso	387	Diidroorotato desidrogenase de <i>S. pombe</i> , <i>Rattus rattus</i> , <i>Drosophila melanogaster</i> , <i>Streptomyces coelicolor</i> , etc.	124
M5A7R	Reverso	405	-	15
M5H1R	Reverso	432	-	32
M5H2R	Reverso	357	-	1
M6A2R	Reverso	289	-	78
M7D5R	Reverso	379	-	93
M10A1R	Reverso	395	-	74
P11C1R	Reverso	384	-	216
P14A1R	Reverso	392	Proteína YOR1 do cassete ATP-transportador de <i>N. crassa</i> Transportador ABC (AtMRP2) de <i>A. thaliana</i> Transportador ABC putativo tipo-MRP de <i>Oryza sativa</i> Cassete ATP-transportador, subfamília C de <i>H. sapiens</i> , etc.	2
P15G12R	Reverso	370	-	14
P21D2R	Reverso	387	-	9
P24A1R	Reverso	391	-	3
P31E3R	Reverso	419	-	3

a= sequências genômicas do White Rot Genome Project, com as quais os fragmentos do mini-banco alinharam.

Como pode ser observado na Tabela 4, dos dezoito fragmentos sequenciados somente quatro alinharam com proteínas de interesse. Uma explicação seria o fato de que os fragmentos sequenciados podem apresentar seqüências de *introns*, os quais não codificam proteínas, de forma que as seqüências não alinharam pelo BLASTX. Entretanto, como citado anteriormente, as seqüências obtidas foram inicialmente alinhadas com seqüências depositadas no GenBank pelo algoritmo BLASTN, utilizado para comparar seqüências nucleotídicas, porém somente regiões muito pequenas dos fragmentos isolados neste estudo alinharam, não sendo possível determinar nenhuma homologia através desta abordagem.

A seqüência obtida para o fragmento M4C5 quando foi usado o *primer* reverso no sequenciamento, alinhou no BLASTX com a seqüência da proteína diidroorodato desidrogenase das mais variadas espécies, incluindo fungos, bactérias, vegetais e mamíferos, em especial com o precursor desta proteína em *Schizosaccharomyces pombe*, com 38% de identidade. Entretanto, como não foi depositada no banco de dados a seqüência de nucleotídeos do gene para *S. pombe* somente do mRNA, o alinhamento pelo CLUSTALW (1.81), mostrado abaixo, foi feito com a seqüência do gene da diidroorotato desidrogenase de *Streptomyces coelicolor* como o qual também houve alinhamento.

```

M4C5R          -----TAGACTGAAACATTACGACGAGCACGTCTGCGTAGGGCGCGAACGCATGTAC 53
DHDO S.coelicolor CTGCCTTCCGCTGGATCCGCCTCGCCGTCCGCGTCCCCGTCTGCGCACCTTCGT-CGC 119
                *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
M4C5R          ACCCGCGATAAAGTC--GCTA-ATGGAGTCCGGCGGCGAGGACTTGTCTTGCCAAGGTT 110
DHDO S.coelicolor CGCCGCGCTCGCGCCCCGCCACAAGGAAGTGCACCGAGGCCCTCGGCCTGCGCATGC- 178
                ***** *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
M4C5R          GACCGCGAGCAGGGCACCATTGCGAAGTGATGTAGGTACGTGCGCGTCTGCTACTCGTGGAA 170
DHDO S.coelicolor -ACGGCCCCCTTCGGCTTCGCCCGCGGGTTCGACAAGAACGCGGTGCGCAT--CGACGGCA 235
                *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
M4C5R          TGTGGGAATGCGGTCTGCGAGGCGGTTGAGCACCATGGTGTGTCCGTCCGAGGGGAAGCC 230
DHDO S.coelicolor TGGCGATGCTCGGCTTCGACCACG-TCGAGATCGGCACCGTGACGGGG-GAGCCGACGCC 293
                *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
M4C5R          ATAGCGGTTGATGAGGCCAAGGT-CTGCCGGAAGGTGGAACACGCGGGGTTGCGGGAAGC 289
DHDO S.coelicolor CGGCAACCCCAAGAAGCGGCTGTTCGCCTGGTGGCCGACCGTGCGTGATCAACCGCAT 353
                *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
M4C5R          CGGGCTAGATGGGTAGGGCATGCTATAGTTAGTGAACCGTGTAGTCTAGCGTGTGCTGG 349
DHDO S.coelicolor GGGCTTCAACAACGACGGCTCGCTGGCCGTGCGGGCCGCG-CTGGCCTCCCGCACGCCCG 412
                *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
M4C5R          GCTCTGGGCACCGCAGACGGGCTCGGGCTCACTGCGGC----- 387
DHDO S.coelicolor TCTTCCG-CACCGTCGTCGGCGTCAACATCGGCAAGACGAAGGTGCTCCCCGAGGAGGAG 471
                *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

```

A diidroorotato desidrogenase (DHOD) é uma flavoproteína que catalisa a oxidação do diidroorotato (DHO) em orotato em uma reação “pingue-pongue”. Esta reação é o quarto passo e a única reação redox na biossíntese *de novo* da pirimidina, a qual é requerida para

suprir os precursores na síntese de RNA e DNA. Na primeira metade da reação, a enzima FMN (*flavin mononucleotide*) é reduzida por DHO. Na segunda metade da reação uma ampla gama de aceptores de elétrons são usados para reoxidar o cofator da flavina (Björnberg *et al.*, 2001). A DHOD de *E. coli* é uma enzima ligada à membrana e contém uma FMN ligada a sua estrutura a qual é capaz de usar ubiquinona como o substrato de oxidação (Palfey *et al.*, 2001). Segundo Löffler *et al.* (1996) a DHOD catalisa o quarto passo sequencial da síntese *de novo* de uridina monofosfato. Em eucariotos esta enzima está localizada na membrana interna da mitocôndria, com a ubiquinona como o sistema proximal de transferência de elétrons e a citocromo oxidase como sistema final, enquanto que o restante da biossíntese de pirimidina ocorre no citosol. Altas atividades de diidrorotato desidrogenase foram observadas em tecidos com conhecida atividade proliferativa, regenerativa, de grande absorção ou excreção, ou seja, células da mucosa do íleo e das criptas do cólon no trato gastrointestinal, células tumorais cultivadas e túbulos do córtex do rim. As menores atividades foram observadas na área periportal do fígado, testículos, próstata e outras glândulas, e músculo esquelético.

A sequência do fragmento M3A2 alinhou com o gene *iutA* que codifica o precursor do receptor da aerobactina, sideróforo tipo hidroxamato de *V. parahaemolyticus*. O alinhamento no CLUSTALW da sequência do gene *iutA* e a sequência de M3A2 está mostrado abaixo.

```

M3A2                -----GCCGTACCGGACCGGCCCGCTGAAA-CGTC 29
IutA-Vibrio         CTTTCAGGCGCGACCTCCATTATGGGGCTGGTGCACGGGTGGTGTCTTAACATCATC 480
                      * * * * *
M3A2                ATCTGCC--GCTTTCTCATACCGCTGGGAGGCCGACTCAATTGCCGCT----CTGCACAC 83
IutA-Vibrio         ACTAAAAAGCGTACTCAGATGAATTGGCGTTTGAATCTTTTTCGGCGGTACGTCAGGC 540
                      * * * * *
M3A2                CGCAAGATCA-TGACTCGCTCGGCTCCGGCGCGACAACGATCCAC-----ATGA 131
IutA-Vibrio         TTCAACAGCAGCGATGATTTTACTACAAAGTCGCA-CAATCCGTTGCTGGTGGAAATGA 599
                      * * * * *
M3A2                TGCGCCAACTGCTCGATCTTCTGATGGTCTGGCTCGAGCCTCGACATGCATT-GACT-AG 189
IutA-Vibrio         CATCGTAAAAGCAGC-TGGCTCAGTGGTGTATTCCGAGACACAAGGTGCATTTGACGGAA 658
                      * * * * *
M3A2                ATGGCGTCAGATACGGGACGAAGATCT----GGGTCCCTACGAATTGATGCCCCAAACA 244
IutA-Vibrio         ATGGTGACATTGTACGCCAGACATTTCTCAAGGTTCTCTGCAATACAACCTCAACGCTTG 718
                      * * * * *
M3A2                ATTTGA--GTGTCCATAGCTAGACGTAACCTTTTCAATAACCTCACTGCTACTCCGTCCTC 302
IutA-Vibrio         ATGTTATGGGGTCGGCAG--AGATCCAAATCTCCGATGCCAGCAA-GTTAAACCTTGTCTG 775
                      * * * * *
M3A2                TGGAGTAC----ATTTCAACAATTTTGTCTCATCTCGGTGCGTAGATCTTATAGCAGCCAT 358
IutA-Vibrio         CGCAATACTATGACAGCCAGCAAGATTCGCCATACGGCTTGTACATTGT-TAATAGCAAA 834
                      * * * * *
M3A2                TAT-TTGGAGAACGAA----- 373
IutA-Vibrio         TTTGTTGATGTGCGAAAAGGGTTCGATTCCGATCGTGAGCATGGTACAGACGCTGTACTT 894
                      * * * * *

```

Ainda, a sequência obtida para o fragmento P31E3 alinhou com o gene *IucA* que possui 771 nucleotídeos de *Halobacterium* sp. NRC-1. O alinhamento entre as sequências está mostrado a seguir.

```

P31E3      -----TTCG 4
IucA      ATGACAGCGCCACTGCCCGAATCACGAGCGACTACGCGTATCGCCGCCCTGACCCCCAG 60
          *
P31E3      GTC-ACGGTCGTGCGGCGTCCACGCTGG--GCATGC-ATCGATATCGAAATGCCCTCCGG 60
IucA      ATCGACCGCACCGTCGCGTTCCGGCGGGTGGCACTCGACCGCGACCTGGGCCGCTGCAC 120
          ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P31E3      ACCTTGTCCTCAGTCCACCACCTCCGCCCCCATAACACGACCCGGACACTCCTCAGGAAA 120
IucA      GCGTGGCTCACCAGCGACCACTCA--CCCCCTACTGGAGCCTGGGTGCGCCGCTGCCG- 177
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P31E3      ATGGCCACCGTGAACCTCTCGACCGAACGCTTCTCGCGACCGCGACACCCC--CGTG 177
IucA      --GCGTTCCATCAGGCGATCGGT-GACCACCTTGAGGACGACCACTCACCAGCGTACGTC 234
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P31E3      TGCAGCCTCGACGTAGC-----CAAGTCGTTTCGACAGCTTACGTATG-----TG 222
IucA      GGCTGCATCGACGGCGTGCCGATGAGTTACGTGGAGCGCTACTGGGTGGCCGCCGACCCG 294
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P31E3      CAGATCACCCGGTACAATGTAGA-GAC--TTACCAGGATCTGTACATAGTTCAAAGGA-G 278
IucA      CTGGCCGACCACTACGACGCCGACGACAACGACAGGCGATCCACATCCTCATCGGGCCG 354
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P31E3      AAGAAGTACGCCCACTACATCGCCAGGCCTCTTGGGCGGGCGCACGGATCATCCAAG-- 336
IucA      CCGGAGTACCTCGGCCAGGGCTGTGGCACCCGCGCTGTTGCGCGCGATGACCGCGCTTGCG 414
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
P31E3      ----AGCAGACTACCC----- 348
IucA      TTCCGGCAGCGCCGCCACCGACCGGGTGGTTCGCGGAACCCGACGCCACCAACGACGCCGCC 474
          * * * * *

```

A aerobactina é um sideróforo do tipo hidroxamato e foi descrita inicialmente em *E. coli*. Os genes envolvidos na biossíntese e no transporte da aerobactina são denominados *iuc* (*iron uptake chelate*) e *iut* (*iron uptake transport*) e estão organizados em um *operon* que contém cinco *ORF's* as quais correspondem aos genes *iucA*, *iucB*, *iucC* e *iucD*, que codificam as enzimas da rota biossintética da aerobactina e o gene *iutA* que codifica o receptor de membrana externa de complexos ferro-aerobactina. As seqüências dos genes *iucABCD* são emparelhados de forma compacta, sem qualquer seqüência intergênica. Os genes *iucA* e *iucC* determinam as duas subunidades do complexo da aerobactina sintetase e mostram uma homologia considerável dentro de três faixas da sua seqüência de aminoácidos (Martinez *et al.*, 1994). A seqüência operadora *iron box* para a ligação de proteínas repressoras Fur que respondem à ferro(II) foi encontrada dentro da região codificadora de *iucA* sugerindo que o *operon* é alvo de um nível adicional de repressão transcricional por ferro (III) (Bagg & Neilands, 1987; Martinez *et al.*, 1994).

O alinhamento das seqüências dos clones M3A2 e P31E3 com genes do *operon* do sideróforo aerobactina, pode indicar o envolvimento de uma organização semelhante dos genes de síntese e de transporte de sideróforos em *P. chrysosporium*.

Por último, com a construção do mini-banco foi isolado o fragmento P14A1 cuja seqüência alinhou, tanto no sentido direto como no reverso, com forte similaridade com seqüências de proteínas transportadoras de fungos, bactérias, vegetais e mamíferos.

Entre estes alinhamentos verificou-se que tanto as 388 bases da extremidade 5' como

as 422 bases da extremidade 3' seqüenciadas do fragmento P14A1 alinharam com a proteína transportadora YOR1, do sistema ABC de *Neurospora crassa*. A seqüência direta mostrou identidade de 35%, alinhando em uma região de 42 aminoácidos com a proteína YOR1 e a seqüência reversa alinhou com uma identidade de 31% entre a seqüência de aminoácidos deduzida e o transportador ABC de *N. crassa*. O gene *yor1* deste fungo possui 4.527 nucleotídeos e é composto por três *exons* e dois *introns*. Entretanto, uma vez este gene que foi isolado a partir do sequenciamento do genoma completo do fungo, o papel da proteína YOR1 no metabolismo do mesmo permanece indeterminado.

O alinhamento feito no CLUSTALW, permitiu verificar que a seqüência inicialmente obtida para o fragmento P14A1, alinha com o *exon 3* (1105-4527) do gene de *N. crassa*.

```

CloneP14A1      -----TTTGTCTCAGCCTGCCC 17
N. crassa      CTCAACATTGCCCGTGCATTACTTTGATGCCGATATCGTTCTCATGGACGACCCCTG 2340
                * * * * *

CloneP14A1      AGT-----CGACGCTCACGTCGGGCGTGCACTATTCAACGATGCGATTATCGGCGCTCTT 72
N. crassa      AGTGCCGTCGATGCCACGTGGGTGCGCATATCTTCGACAACGCTATTCTTGTTTGTCTC 2400
                ***      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

CloneP14A1      CGAAACCGCGGAAGACTGTTATCCTTGTCAACCCACGCCCTTCACTTCCTCTCACAATGC 132
N. crassa      AAAGAC-----AAGGCCCGTATTTGGCAACTCATCAACTCTGGGTCTTAACCGCTGC 2454
                * * *      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

CloneP14A1      GACTACATCTACACCATCGACAACGGTTACATCTCGGCGCAGGGGAAATACTATGATCTT 192
N. crassa      GACCGCATCATTTGGATGGATGGTGGTTCGTTATTCAGGCTGTGGATACTTTCGACACCTT 2514
                *** * * * *      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

CloneP14A1      CTGGAACATCATGTACGTTTCGCTAAGCTCATGAAGGAATTTGGCGGAGAGGACAGCAC 252
N. crassa      ATGAGGGATTCCGAGGAGTTCAGACAGCTCCTAGAATCGACTGCCCAAGAAGAAAAGAAG 2574
                **      * * *      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

CloneP14A1      GAGGAGGAGG-----TCGAGGCGGAGGAAGCGGCTATGGCCCAA-----G 292
N. crassa      GATGAAGCCGAAGCTCTGCCGCAACAGCGAGGAAGAAGCGCCCAAGAAGAAAAGAAG 2634
                * * * * *      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

CloneP14A1      TCCAGCGTCCAATCCCGA-TGTCGAG-----GAGGCCAA-GCTCAAGAGTGAGG---- 340
N. crassa      GCCAAGGTCTCATGCAGGCTGAGGAGCGTGCTGTGGCTAGCGTCCCATGGTCGGTTTAT 2694
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

CloneP14A1      ACATCGAGCGAAAAGGC-----GCGGGAACGGGAAAGCTGGAA--GGTCGCCTTATCGTG 393
N. crassa      ACGTCTACGTCAAGGCCTCCGGCAGCTATCTCAACGCCCCATTGTTCTCGTGCTCCTG 2754
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

CloneP14A1      GTCGACTCTAGAGGATCCCCTGCGAAGGCAGCAGGAGAGCACGTTCCAAGCATGGCTCGC 453
N. crassa      GTTATCTCAGGGATCCAACATCATGACTAGCTTGTGGCTTTCGTGGTGGACTTCTGAC 2814
                **      ***      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

CloneP14A1      GGGGCGGGCATGGCCATCGGCTATTCTGTCTGACGGTAGCAGCCAGCGTGTCTCAGCATC 513
N. crassa      AAGTTTGGCCTGAGTTTGGGGCAATACAT-TGGTGCCTACGCTGGTCTTGGTGCGATGCA 2873
                *      * * * * *      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

CloneP14A1      AGTTCTTCTGGAG----ATCTATGACTATCGGGTTGCTTGCGCGTGCTGCACTCATCGC 568
N. crassa      AGCTCTCCTTATGTTTCGCAATTCATGGTATCTCTATCGATGTTTCGGTACTACGGCGAGTAA 2933
                * * * * *      * * * * *      * * *      * * * * * * * * * * * *

CloneP14A1      GTCCATCTACAAGCGCGGTGTCAATCTTACAG-GCAAAGCCGCACGAACCTCCCGAATC 627
N. crassa      GAACATGTTGAGGCAGGCCACCTTCCGCGTGTTCGCGCGCCCATGCTTTCTTCGACAC 2993
                *      * * * * *      * * *      * * * * * * * * * * * * * * *

CloneP14A1      TGCCCTCGTCAACCACATCTCGACAGATGTCAGTCGTG-TG-GACTCCTGCGCGCAGTGG 685
N. crassa      TACACCTCTCGGTGCGATCACCAACCGTTTCAGCCGTGATGTGGATGTCATGGACAACAA 3053
                * * *      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

CloneP14A1      T-TTGTGAGTTCAATCCGCTTTACACC---GTATTCCAAGTGCTGATAC-ACGTTCT-T 738
N. crassa      CCTTACGGATGCTTTGCGCATGTACTTCTTCAGCATTTGGAGCTATCATCTCGACGTTTGC 3113
                * * *      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

CloneP14A1      TAGCAGCATGGTGTG-TCGAGCTGCGTTTCTATGGCACTTGGACCGCATTGACACGTACT 797
N. crassa      TCTGATCATTTGCATACTTCTATTACTTTGCCATCGCGTTGTACCTCTCTTCACCTTGT 3173
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

CloneP14A1      AGTT----- 801
N. crassa      CCTCTTTGCTACTGGCTACTACCGTTCATCGGCCGCGAGGTCAAACGCTTTGAGGCTGT 3233
                *

```

Os transportadores ABC consistem em proteínas de ligação periplasmáticas, uma ou mais proteínas integrais da membrana e uma ou duas ATPases associadas com interior da membrana citoplasmática (Braun & Killmann, 1999). Como discutido anteriormente, proteínas de transporte da família ABC têm sido amplamente estudadas em bactérias, sendo verificada a participação destas proteínas na absorção dos mais variados tipos de substratos, entre estes o ferro e sideróforos complexados com Fe(III). Em fungos, alguns estudos recentes, tem verificado a produção de proteínas ABC em diferentes espécies, sendo reportado que um papel em uma variedade de funções celulares, entre as quais secreção de feromônios, função mitocondrial, biogênese do peroxissomo, alongação na tradução e reposta ao estresse na rota de detoxificação celular (Bauer *et al.*, 1999).

Em leveduras, várias proteínas ABC descritas apresentam características estruturais indicativas das proteínas do sistema de resistência a multidrogas. A proteína Ycf1p (*Yeast cadmium factor 1*) foi o primeiro membro do sistema MRP (*Multidrug Resistace Proteins*) de *S. cerevisiae* descrito, tendo sido identificada pelo seu importante papel na tolerância a cádmio (Szczypka *et al.*, 1994; Katzmann *et al.*, 1999). O segundo membro do sistema MDR descrito é uma proteína determinante para a resistência à oligomicina, sendo esta proteína denominada Yor1p (*stands for yeast oligomycin resistance protein*). Ainda em leveduras outras proteínas ABC foram identificadas e caracterizadas entre as quais estão a Pdr5, a Sts1/Ydr1 e a Snq2, envolvidas no sistema de resistência pleiotrópica a drogas neste fungo (Cui *et al.*, 1996). Estes e outros genes, do sistema de resistência múltiplo ou pleiotrópico a drogas em levedura, estão sob o controle dos fatores de transcrição Pdr1p e Pdr3p. Estas proteínas possuem um domínio dedo de zinco Zn_2Cys_6 (Zhang *et al.*, 2001).

Em um estudo realizado por Tuttle *et al.* (2003), uma cepa mutante de levedura (MS35) foi isolada por seu crescimento reduzido em condições de baixa concentração de ferro. Estudos adicionais com a cepa mutante permitiram verificar que esta, apresentava o sistema de aquisição de ferro de alta afinidade normal. Outras análises foram realizadas e mostraram que a mutação não estava relacionada com o sistema de aquisição de alta afinidade, sendo sugerido que a incapacidade de crescer em baixas concentrações de ferro deveria ser causada por um defeito no metabolismo intracelular do ferro. Um cruzamento diplóide entre células da cepa MS35 e células do tipo selvagem mostrou que o fenótipo de crescimento defectivo era semidominante. A análise da transcrição de mRNA comparando as cepas,

mutante e selvagem, mostrou que na cepa MS35 houve um aumento na expressão de pelo menos 19 genes, sendo que alguns destes genes foram identificados como codificantes de proteínas de transporte pertencentes à família ABC, os quais são controlados por dois fatores de transcrição homólogos, Pdr1p e Pdr3p.

Vários experimentos realizados pelos pesquisadores, indicaram que a cepa mutante MS35 teve um ganho de função com a mutação no gene que codifica Pdr1p. Um dos experimentos realizados foi a transformação de células do tipo selvagem com uma biblioteca genômica derivada de MS35 e clonada em plasmídios cópia única, o que resultou na identificação de plasmídios com fenótipo de crescimento defectivo em meio com baixa concentração de ferro. A análise das seqüências dos genes codificados por dois destes plasmídios revelaram que o gene *PDR1* apresentava uma mutação que consistia na substituição de uma histidina para arginina na posição 821.

No passo seguinte, os pesquisadores transformaram o alelo mutante *PDR1(R821H)* em cepas diferentes carregando uma única deleção em 15 dos genes os quais se verificou aumento da expressão devida a mutação do alelo de *PDR1*. Desta forma, verificou-se que a deleção de seis destes genes resultavam na perda do crescimento defectivo em meio com baixa concentração de ferro. Os seis genes requeridos para baixa sensibilidade ao ferro foram o *YOR1*, *SNQ2*, *TPO1*, *CTP1*, *YGR035C* e *YMR102C*. Os resultados, obtidos pelos autores, sugerem que todos estes seis genes devem ser superexpressos para o fenótipo defectivo, e que a perda de qualquer um dos seis genes foi suficiente para complementar a expressão do alelo mutante *PDR1 (R821H)* sendo que desta forma o alelo mutante pode proteger as células de levedura a partir da alta toxicidade do ferro. Os autores verificaram que a deleção de *YOR1* não afeta a resistência a multidrogas, mas por outro lado resulta na perda do defeito de crescimento em baixas concentrações de ferro. Entretanto, dados sobre o papel dos genes do sistema de resistência a multidrogas (MDR) no metabolismo de metais são limitados na literatura (Tuttle *et al.*, 2003).

Os resultados obtidos por Tuttle *et al.* (2003) sugerem que os genes regulados por *PDR1*, dependendo da concentração de ferro, podem afetar tanto o efluxo de ferro como o seqüestro a partir do meio. A hipótese de que tanto o efluxo como o seqüestro de ferro ocorre é fortalecida pela identificação dos seis genes requeridos para produzir o fenótipo defectivo.

Entre estes genes, três codificam proteínas transportadoras ABC presentes no vacúolo (*TPO1*) ou na membrana plasmática (*YOR1* e *SNQ2*).

Outros fragmentos isolados neste estudo mostraram homologia com proteínas transportadoras ABC. Pela metodologia de *display* diferencial (Capítulo 2) foi isolado o fragmento C5.26d o qual alinhou com 44% de similaridade com uma permease putativa do tipo ABC, a expressão deste transcrito foi aumentada na condição de carência de ferro(III) no meio de cultivo. Ainda os fragmentos 15.6 e 15.12, isolados como descrito no Capítulo 4, apresentaram forte homologia com ATPases de diversas espécies, sendo que a identidade mais significativa (39%) foi com uma provável ATPase transportadora de cálcio de *S. pombe*. Entretanto, a expressão regulada por ferro destes transcritos não foi confirmada pela análise de *Northern blotting*.

Com o isolamento do fragmento P14A1 surgiu a oportunidade de se caracterizar em *P. chrysosporium* um gene da família de transportadores ABC.

Cabe ressaltar, que o fragmento P14A1 mostrou homologia, com a maior identidade, com a proteína YOR1 de *N. crassa* e também com mais 308 proteínas envolvidas no sistema de resistência a multidrogas das mais variadas espécies depositadas no GenBank. Entretanto, não foi observado o alinhamento da sequência do fragmento P14A1, de 2.293 pb, com a proteína YOR1 de *S. cerevisiae*. Por outro lado, ao alinhar a proteína YOR1 de *N. crassa* com a proteína de *S. cerevisiae*, obtém-se uma forte similaridade (55%). Uma explicação para isto poderia ser o fato de que a região sequenciada do gene ABC de *P. chrysosporium* seja uma região do gene menos conservada evolutivamente ou ainda que não contenha os domínios mais conservados entre os transportadores da família ABC. A obtenção da sequência completa do transcrito deste gene tornou-se importante para elucidar esta questão.

3.2 Isolamento da sequência completa do gene P14A1

3.2.1 Obtenção da sequência completa do inserto do fragmento P14A1

Com o isolamento do fragmento P14A1, cuja sequência da região 5' (388 bases) e da região 3' (422 bases) apresentou homologia com inúmeras proteínas da família ABC de transportadores, entre eles a proteína YOR1, um transportador tipo-ABC isolado em *N. crassa*, decidiu-se obter a sequência completa do gene e do transcrito que codifica a proteína do tipo

ABC em *P. chrysosporium*. Para tanto, inicialmente *primers* específicos foram desenhados com base nas seqüências das extremidades 5' e 3' obtidas de P14A1. Desta forma, à medida que o fragmento P14A1 era sequenciado novos *primers* eram desenhados até que o sequenciamento dos 2.297 pb do fragmento P14A1 se completasse.

3.2.2 Obtenção da seqüência completa do transcrito de P14A1

Após a obtenção da seqüência do fragmento P14A1, partiu-se para a obtenção da seqüência genômica e do transcrito completas do gene ABC (P14A1) de *P. chrysosporium*.

No ano de 2001 foi iniciado o **White Rot Genome Project** para o sequenciamento completo do genoma de *P. chrysosporium*, sendo este projeto desenvolvido pelo DOE Join Genome Institute, operado pela Universidade da Califórnia para o Departamento de Energia dos Estados Unidos. Os resultados obtidos no sequenciamento do genoma deste fungo podem ser acessados através da página na Internet do DOE Join Genome Institute, sendo disponibilizada a opção de alinhamento, através do programa BLAST *White Rot* (BLASTN 2.1.2), com as seqüências já obtidas.

Assim, procedemos ao alinhamento da seqüência de P14A1 com as seqüências do projeto genoma de *P. chrysosporium*. Com isto, verificamos que a seqüência do inserto P14A1 alinhava com o *Scaffold 2* do banco de dados o qual é composto de 552.342 bases. Com esta informação foi possível obter a seqüência de DNA completa do gene putativo relacionado ao fragmento P14A1 isolado neste estudo.

Embora não haja ainda a anotação do genoma, pela homologia aqui apresentada pode-se concluir que a seqüência genômica codificadora de um transportador do tipo ABC de *P. chrysosporium* já está sequenciada, portanto tornou-se interessante obter a seqüência completa do transcrito de P14A1 de *P. chrysosporium*. Para obtenção da seqüência do transcrito do gene ABC, foram desenhados, com base na seqüência do mesmo, *primers* internos e para as extremidades 5' e 3' que foram utilizados juntamente com cDNAs 3' RACE e 5' RACE de micélio crescido em ausência ou presença de ferro em reações de amplificação. Como controle foram feitas reações de amplificação com o DNA genômico do fungo com cada conjunto de *primer* utilizado. Desta forma foi possível verificar que somente a partir de cDNA de micélio crescido sem suprimento de ferro(III) no meio de cultivo e sintetizado pelo sistema 3' RACE foram amplificados fragmentos que correspondiam ao transcrito do gene ABC. Para as reações

de amplificação feitas com cDNA 3' RACE de micélio crescido com ferro e cDNA 5' RACE independentemente da condição de suprimento de ferro, verificou-se que o tamanho do fragmento amplificado sempre correspondeu ao tamanho obtido quando a amplificação foi realizada a partir de DNA, ou ainda, não foi verificada amplificação. Como exemplo, os resultados obtidos nas reações de amplificação com os *primers* Exon1fow e DABCrev1 estão mostrados na Figura 4.

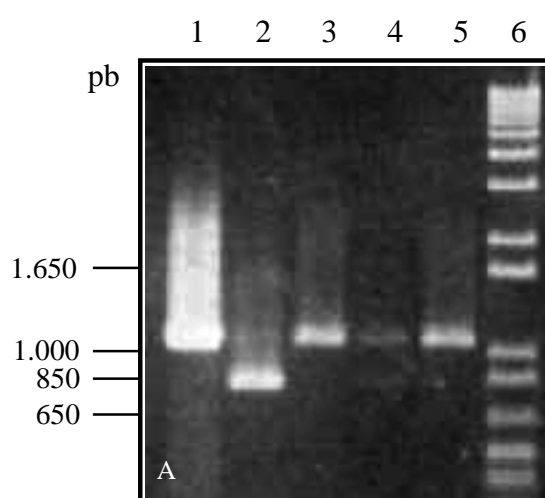


Figura 4. Gel de agarose com a reação de amplificação de um fragmento do transcrito do gene ABC de *P. chrysosporium* com os *primers* Exon1fow1 e DABCrev1 a partir de molde de: Linha 1. DNA; Linha 2. cDNA 3' RACE, cultivo sem ferro; Linha 3. cDNA 3' RACE, cultivo com ferro; Linha 4. cDNA 5' RACE, cultivo sem ferro; Linha 5. cDNA 5' RACE, cultivo com ferro e Linha 6. Marcador de peso molecular 1 Kb Plus (InvitrogenTM).

Os produtos das PCRs que diferiram do tamanho do fragmento amplificado a partir de DNA foram clonados no vetor pGEM®-T Easy e sequenciados.

Na Tabela 5, está mostrado um resumo dos fragmentos parciais clonados, com o nome dos *primers* utilizados para a obtenção destes fragmentos e os *primers* utilizados para o sequenciamento completo dos mesmos. Os fragmentos estão apresentados de acordo com os *exons* os quais compreendem.

Tabela 5. Resumo dos *primers* utilizados para a amplificação dos fragmentos parciais do transcrito ABC e dos *primers* usados no sequenciamento destes fragmentos para a obtenção da sequência completa do cDNA do gene ABC de *P. chrysosporium*.

<i>Exons</i>	<i>Primers</i> usados para amplificação dos fragmentos		Posição	Número de Bases	<i>Primers</i> usados no Sequenciamento
	Extremidade 5'	Extremidade 3'			
1-6 ^a	Exon1fow1	DABCreval	1-824	824	M13foward ABCfow1 M13reverse
6 ^a -15 ^a	DABCfow1	RABCreval	806-2.253	1.448	M13foward ABCfow2 ABCfow3 Exon6rev1 P14A1Rint2 ABCrev3 M13reverse
15 ^a -23 ^a	RABCfow1	ABCrev6	2.243-3.225	983	RABCfow1
15 ^a -31	RABCfow3	Exon18rev3	2.403-4.359	1.957	M13foward ABCfow4 ABCrev4 ABCfow5 ABCrev5 M13reverse

a= somente uma parte do *exon* está incluída no fragmento.

Com isso foi possível obter a sequência completa do transcrito do gene de *P. chrysosporium* que codifica uma proteína homóloga a inúmeros transportadores da família ABC das mais variadas espécies. Este gene é composto por 31 *exons* e 30 *introns* num total de 5.926 pb, sendo o transcrito composto por 4.359 pb como mostrado na Figura 5.

Na Figura 6, está mostrada uma representação esquemática do gene, com os *exons* *introns* e na Tabela 6 estão citados os números de bases de cada *exon* e *intron*.

1 ATGGCCAACA GCGAGGTGAA CGATAGGGTC AGCGAGAAGG ACACCGATTC CGTCGAGACA AAGCAAGTCA AGGATGCATC GCCTAAAGTC CAGGCACGTG AGGGTCCAAG GGTCTGCTCTG
Exon1fowl
121 GACGCTGGTG AGCAGCACCT GCGCGTCAGG CGACGTTGGT GGCAGCTCTG GTTGCCGAAG AACCCGCCCC CACCACCACC CACATCTTTT GAGGATGCAC CTATTACACC GCTTGCAGAC
241 GCATCCCTGC TGTCCATGCT CACGTATACA TGGATTACGC CTATCATGAC TTTAGGTTAC CAGCGTACGC TGCAGGCGAC AGACTTGTGG AAAGTGGATG AAGCTAGACA AAGTGGTCTT
ABCfowl
361 CTCGGTGCCA AACTTGACGC AGCCTGGGAT AGGCGTGTGA AAGAGGCTGA TGA CTGGAAT CGCCGCTCTGG ACGCCGAGAGA GATACATCCA CCATGGTACC TGCGGATGAA GTGGTTCTTC
481 ATTGCTCTAT TTTTCTGGAA CCACGGTCCA TGGAAGGCTG GTGCAGGGTT TAGGCAGCGC AGAGCAGCGC TCGAGCACCA CTGGCTCACT GTCGGTGGAC GCAAGCAAGC TAGTCTGGTA
601 TGGGCTCTGA ACGATTACCT GGTCTATCTT TCTTGATAG GAGGCTGCTT CAAAGTCTTC GTTGATACGG CCGAGCTGAT CCGGACCTTA CTGGTGAAGG CCATCATCAA CTCTAGCAAA
721 GAGCGTGCAG CTGCGAAGGC AGCAGGAGAG CACGTTCCAA GCATGGCTCG CGGGGCGGGC ATGGCCATCG GCCTGTTCTG TCTGACGGTA GCAGCCAGCG TGTCTCAGCA TCAGTTCTTC
DABCfowl/DABCrev1
841 TGGAGATCTA TGA CTACTGG GTTGCTTGCG CGTGCTGCAC TCATCGCGTC CATCTACAAG CGCGGTGTCA ATCTTACAGG CAAAGCCCGC ACGAACTTCC CGAACTCTGC CCTCGTCAAC
961 CACATCTCGA CAGATGTCAG TCGTGTGGAC TCCTGCGCGC AGTGGTTTCA CGCTGTTTGG ACTGCCCAA TTCAGGTTAC GGTCTGCCTA GTCATCTTGC TGGTTCAGCT TGGCCCCCTCT
ABCfowl2
1081 GCGCTTGTCG GCTTCTCCCT GTTGTCGTG TTGATCCCGT TGCAACAGCG TATCATGGGC ATGCAATTCA AGCTAAGAAA GAAGACCAAC ATTTGGACAG ACTCTAGGGC CAAGACACTT
1201 CTCGAGGTCT TGGGTGCGAT GAGAGTTGTG AAATACCTTCT CATACGAGGT ACCCTTCTCTG AAGAAGATAT ATGAGATGCG AAAGAACGAA CTCAAAGGCA TCAAGGTTAT TCAGGTCGCC
1321 CGCTCGGAA ACGGTGCGT GCGGTTCTCC ATTCCAGTAG CTCAGCGCAG CTCTATCGTTT GTTCAGGTTC CCGGACCGC CCACAACCTT AACGTGAGCG TCATCTTCGC TCTCTGTCG
1441 CTTTTCAGT TGCTTCGCCA GCGGCTCATG TTCTTGCCGC GCGCGCTCTC CTCCACGACG GACGCGCAGA CCGCACTCGT CCGCCTTACG GAGCTCTTCA AGGCCCCGCT TATGGACCGC
ABCfowl3
1561 GCACCGTTTCG ACGTCGACCC GTCGCGAAG CTCGCGCTCG AGGTGCGCGA CGCGACCTTC GAGTGGGAGG AGAGTCTCGC CACGAAGGAG GCCAAGGAGG CGCTGGCAAA CTCGAAGGGT
1681 AAGAGGGGCA AGGTGCTGCG GCGCGCAAG GCAATGGACG CCAAGGACGA CTCTCCGCGG TTCCAGGTTC CGAGTGTGAC GATGCTCGTT CCCGCGGCT CGCTGTGCGC TATCGTTGGT
1801 GCTGTGGGCA GCGCAAGTC TAGCCTGCTG CTCGGTCTCA TCGGAGAAAT GCGCAAGCTC GCGGGGCATG TTTCGTTTGG CGGACCAGTA GCATATTGTG CACAGACGGC GTGGATCCAG
P14A1Rint2
1921 AATGCGACAT TGAGGGAGAA TATTACTTTC GGA CTACCTT TTGACGAGGA CAGATACTGG AAGGCGGTGG AAGATGCATC CCTGATTCTT GACTTGCAGG TCCTGGCAGA CGGTGATCTG
P14A1Rint2(cont.)
2041 ACCGAGATCG GCGAAAAAGG TATCAACTTG AGTGGTGGTC AGAAGCAGCG GGTCAACATC GCTCGTGCAG TGTACCATGA CGCCGACATT GTCCTGTTTG ACGACCCTCT GTCTGCCGTC
2161 GACGCTCAGC TCGGGCGTGC ACTATTCAAC GATGCGATTA TCGGCGCTCT TCGAAACCGC GGAAGACTG TTATCCTTGT CACCCACGCC CTTCACCTCC TCTCACAATG CGACTACATC
RABCrev1
2281 TACACCATCG ACAACGGTTA CATCTCGGCG CAGGGGAAAT ACTATGACCT TCTGGAACAT GATGTCACGT TCGCTAAGCT CATGAAGGAA TTTGGCGGAG AGGACAAGCA CGAGGAGGAG
2401 GTCGAGGCGG AGGAAGCGGC TATGGCCCAA GTCCCAGCGT CCAATCCCGA TGTCGAGGAG GCCAAGCTCA AGAGTGAGGA CATCGAGCGA AAAGCGCGG GAACGGGAAA GCTGGAAGGC
RABCfowl3
2521 CGCCTTATCG TAGCGGAGAA ACGGTCTACT GGGTCCGTCA GCTGGAAAGT CTATGGTGCC TACTTGCAAG CCGGCCGCTG GATGCTCACC ATACCATGGC TTCTCCTATT CATGGTACTG
2641 ATGCAAGCCA GCCAAATCCT GAACTCTTAC ACTCTAGTCT GGTGGGAGGG AAACACCTGG CACCGTCCAA ACTCGTTCTA CCAGACCTTG TACGCTGCTG TGGGTATTGG CCAAGCGCTG
2761 TTCACATTCT TGCTCGGTGT TGCTATGGAC GAGATGGGAG CCTATGTCTC GAAGAATCTG CATCATGACG CGATTAAGAA CATCTTCTAT GCGCCAATGT CTTTCTTTCG TACAACGCCA
ABCfowl4
2881 ACTGGTCGTA TCCTCAGTAT ATTCGAAAAG GATATTGATA ATATCGATAA TCAGCTTCCC GTTTCATGCG GTTTGTTTCA CTCTACCGTC GCGAACGTCA TCGGCTCTGT TCTCATCATC
3001 ACCGTCTTGG AGCATTACTT CCTCATCGCG GCGGTGTTCA TCGCAGTCCG ATACCAATAC TTTCGCGGCTT TCTATCGAGA GAGTGTCTCG GAATTGAAGC GTCTCGACTC TATGCTTCTG
ABCrev4
3121 TCTTTCCTTT ACGCCCACTT CGCAGAGTCA CTCTCTGGCC TTCCCACTAT CCGCAGCTAT GCGGAGATTC CGCGATTTTT GCATGACAAC GAGTATTACA CCGATTTGGA AGATCGCGCC
ABCrev6
3241 GCATTCTTGA CCGTCACGAA TCAGAGATGG CTTGCCATTG GCCTGGACTT CCTGGGTGGC CTGATGACGT TCGTCTGTGC CATGCTCGCC GTTGCCGCCG TGTCCGGTAT CAACCCCGCA
ABCrev4b
3361 CAAATCGGTC TCGTTCTTAC CTACACAACG AGTCTTACCC AAAGTTGCGG TGTCGTCACA CGGCAGTCCG CTGAAGTTGA AAAGTATATG GCCTCAGTGG AGACTGTGAC TCATTACAGC
3481 CATGCAAAA ATATTGCACA AGAAGCCCCA CACGAAATCC CAGAGAACAA ACCCCCTGCG GAGTGGCCGC GCGACGCGC GATCGAGTTC AATAACATCG TCATGCGCTA CAGACCAGGT
ABCfowl5
3601 CTGCCGTACG TGCTCAAGGG TATTACTCTA AGCATCCGTG GAGGAGAGAA GATTGGCGTT GTTGGCAGGA CTGGCGCCGG CAAGAGTTCTG CTCATGCTGG CTTTATTCCG CATCGTTGAG
3721 CTTGCCGGTG GTTCGATTAC CATCGACGGT ATTGACATCT CGAAGATCAG CCTTAGAGAC TTGCGCACCA AGATCGCCAT CATTCCCCAG GATCTCTTTC TGTTCAGTGG CACAATTGCG
3841 AGCAACTTGG ACCCCTTCAA CATGTACGAC GACGCGCGAC TTTGGGATGC TCTGCGACGA TCATACCTCA TCGAGTCAAC GACCCCTGAG GAGACGGTTG ACGTAAAAGA CACGAACAAG
3961 ACACGATTCA CCTGAGACAC GCTCATTGAA AGCGAGGGCG CCAACCTAAG TGTGAGAGAG CGCAGCCTGC TCAGCCTGGC GCGTGCAATT GTTAAGGACA GCAAGGTCTG GTTCTTGAT
ABCrev5
4081 GAGGCTACTG CTTGCGTTGA TCTTGAGACC GACTCGAAGA TCCAGCAGAC GATCCAGACG CAATTCAAGG AAAAAACCTT GCTATGCATC GCTCATCGCC TTCGTACCAT TATATCTTAC
4201 GATCGCATCC TTGTGCTGGA TGCAGGAGC ATCGCTGAAT TCGACACTCC GCTGAACCTT TTCCTCAAGG CTGACAGCAT CTTCCGTGGT ATGTGCGAGC GTAGCAACAT CTCCTTAGAC
4321 GAGATCCAGA AAGCTGCGCT TCGGCAACA GATGTTTAC
Exon18rev3

Figura 5. Sequência completa do transcrito do gene ABC de *P. chrysosporium*. Pontilhado: *primers* utilizados na obtenção dos fragmentos utilizados para o sequenciamento do transcrito com o respectivo nome citado abaixo; Sublinhado: *primers* utilizados no sequenciamento do transcrito com o respectivo nome citado abaixo.

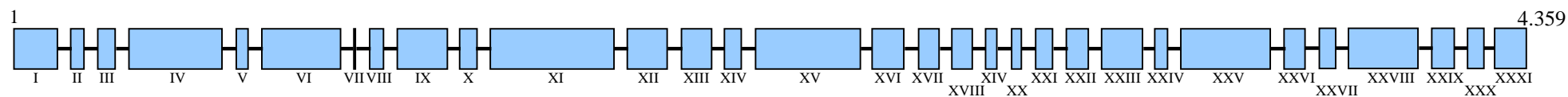


Figura 6. Esquema do gene ABC de *P. chrysosporium*, com os *exons* numerados representados por blocos e os *introns* representados como traços.

Tabela 6. Número de bases de cada *exon* e *intron* do gene ABC de *P. chrysosporium*.

Número	Tamanho do <i>Exon</i> (bases)	Tamanho do <i>Intron</i> (bases)
I	170	53
II	52	52
III	66	55
IV	366	53
V	45	52
VI	309	53
VII	7	51
VIII	53	56
IX	196	50
X	67	49
XI	487	54
XI	156	53
XIII	117	49
XIV	67	52
XV	411	47
XVI	124	54
XVII	81	50
XVIII	103	54
XIX	49	53
XX	36	53
XXI	66	56
XXII	84	52
XXIII	160	48
XXIV	49	51
XXV	353	52
XXVI	81	52
XXVII	64	55
XXVIII	275	54
XXIX	86	54
XXX	62	50
XXXI	123	-

O alinhamento no programa MultAlin v. 5.4.1 (Corpet, 1988) entre a sequência do gene depositada no banco de dados do projeto genoma do fungo *P. chrysosporium*, com a sequência do transcrito obtida neste estudo permitiu verificar que 23 de um total de 4.359 bases diferiram. A maioria das diferenças verificadas devem ser devidas possivelmente à polimorfismos dentro do gene ou ainda a diferenças genéticas entre as linhagens do fungo *P. chrysosporium* utilizadas nos dois estudos, as quais foram provavelmente (não há citação da linhagem utilizada no projeto genoma) diferentes. Somente duas bases que diferiram levaram a uma alteração do aminoácido codificado, as demais modificações foram silenciosas. Na posição 1.755 a base da sequência do transcrito deduzido para a sequência de DNA do projeto genoma White Rot é uma adenina (A) e codifica uma Asparagina (N), sendo o códon AAT; e na sequência obtida neste estudo a base localizada nesta posição é uma guanina (G), sendo que o aminoácido codificado é uma Serina (S), pelo códon AGT. O segunda diferença observada entre as sequências que levou a uma alteração no aminoácido codificado foi verificada na posição 3.769 das sequências comparadas. Na sequência obtida no projeto genoma a base é uma guanina (G) que participa do códon GGC que codifica uma Glicina (G); e na sequência obtida neste estudo a base observada na posição 3.769 é uma adenina (A), sendo codificada uma Serina (S), pelo códon AGC.

Ainda, uma alteração importante na sequência do **White Rot Genome Project** foi verificada na posição 395 do DNA, sendo que na sequência genômica a base localizada nesta posição é uma Citidina (C), entretanto, esta posição coincide com o sítio doador de *splicing* do *intron* 3, sendo que portanto a base deve ser uma Timina (T) como observado neste estudo.

Como citado anteriormente a sequência completa do fragmento P14A1 alinhou com a sequência deduzida da proteína YOR1 de *Neurospora crassa* e não foi verificado alinhamento do fragmento com a proteína Yor1p de *S. cerevisiae*. Por outro lado, quando a sequência de aminoácidos completa (1.452) da proteína foi obtida, deduzindo-se a partir do transcrito completo do gene sequenciado, e comparada com sequências depositadas no GenBank com auxílio do programa BLASTP v. 2.2.6, verificou-se que a proteína ABC de *P. chrysosporium* mostrou homologia com as proteínas Yor1p (1.477 aminoácidos) e Ycf1 de *S. cerevisiae* (51% e 50% de similaridade, respectivamente) e também com a proteína relacionada a YOR1 de *N. crassa* com 53% de similaridade e com diversas proteínas ABC das mais diversas espécies incluindo fungos, plantas, vertebrados. Como discutido anteriormente a proteína Yor1p foi

inicialmente caracterizada por ter um importante papel na resistência à oligomicina (Katzmann *et al.*, 1995), posteriormente foi verificado que a expressão do gene *YOR1*, entre outros, pode afetar tanto o efluxo quanto o armazenamento de metais estando assim envolvido no metabolismo do ferro e de outros metais (Tuttle *et al.*, 2003). Já a proteína Ycf1p é requerida para a resistência ao cádmio. Esta proteína é composta de 1.515 aminoácidos e apresenta uma extensiva homologia à proteína humana associada a resistência a multidrogas (MRP1) e ao regulador da condutividade transmembrana na fibrose cística de humanos (hCFTR). Desta forma, foi sugerido que esta proteína é composta de domínios modulares encontrados em proteínas humanas as quais funcionam no transporte de drogas e íons (Szczypka *et al.*, 1994).

Ainda, a sequência deduzida da proteína ABC obtida neste estudo (Figura 7) foi comparada com domínios conservados depositados nos bancos de dados CDD (*Conserved Domain Database*) v. 1.62, com o auxílio do programa RPS-BLAST 2.2.6.

```

1  MANSEVNDRVSEKDTDSVETKQVKDASPKVQAREGPRVVLDAGEQHRLRVRRRWQLWLPKNPPPPPTSF
71  EDAPITPLATASLLSMLTYTWITPIMTLGYQRTLQATDLWKLDEARQSGPLGAKLDAAWDRRVEADDWN
141  RRLDAGEIHPPWYLRMKWFFIALFFWNHGPWKAGAGFRQRAALEHHWLTVGGRKQASLVWALNDTLGLS
211  FWIGGCFKVFVGDTAQLMGPLLVKAIINFSKERA AKAAGEHVPSMARGAGMAIGLFCLTVAASVSQHQFF
281  WRSMTTGLLARAALIASIYKRGVNLTKARTNFPNSALVNHISTDVS RVDSCAQWFHAVWTAPIQVTVCL
351  VILLVQLGPSALVGFSLFVVLIPLQQRIMGMQFKLRKKTNIWTD SRAKTLLEVLGAMRVVKYFSYEVFPL
421  KKIYEMRKNEKLGKIKVIQVARSGNIALAFSIPVLAATLSFV TYTGTAHNFNVAVIFASFSLFQLLRQPLM
491  FLPRALSSTTDAQTALVRLTELFKAPLMDRAPFDVDPSQKLAL EVRDATFEWEESLATKEAKEALANSKG
561  KRGKGPA AAKAMDAKDDSPPFQVRSVTMLVPRGSLVAIVGAVGSGKSSLLGLIGEMRKLGGHVSFGGPV
631  AYCAQTAWIQNATLRENITFGLPFDEDRYWKAVEDASLIPDLQ VVLADGDLTEIGEKGINLSGGQKQRVNI
701  ARALYHDADIVLFDDPLSAVDAHVGRALFNDAIIGALRNRGKTV ILVTHALHFLSQCDYIYTIDNGYISA
771  QGKYDLDLEHDVTFKLMKEFGGEDKHEEEVEAEAAAMAQVPAS NPDVEEAKLKSEDIERKGAGTGKLEG
841  RLIVA EKRSTG SVSWKVYGAYLQAGRWMLTIPWLLL FFMVLMQASQILNSYTLVWWE GNTWHRPNSFYQTL
911  YACLGIGQALFTFLG VAMDEMGAYVSKNLHHD AIKNI FYAPMSFFDTTPTGRILSIFGKDIDNIDNQLP
981  VSMRLFILT VANVIGSVLIITVLEHYFLIAAVF IAVGYQYFAAFYRESARELKR LDSMLRSFLYAHFAES
1051  LSGLP TIRSYGEIPRFLHDNEY YTDLEDRAAFLTVTNQRWLAI RLDLFLGGLMTFVVAMLA VAAVSGINPA
1121  QIGLVLT YTTSLTQSCGVVTRQSAEVENYMASVETVTHY SHGKNIAQEAPHEIPENKPPAEWPRDGAIEF
1191  NNIVMRYR PGLPYVLKGITLSIRGGEKIGVVGRTGAGKSS LMLALFRIVELAGGSITIDGIDISKISLRD
1261  LRTKIAIIPQDPLLFSGTIRSNLDPFNM YDDARLWDALRRSYL IESTTPDETVDVKDNTKTRFTLDTLIE
1331  SEGANLSV GERSLLSLARALVKDSKVVLDEATASVDLETDS KIQQTITQTQFKDKTLLCIAHRLRTIISY
1401  DRILVLDAGTIAEFDTPNLNLFKADSIFRGM CERSNISLDEIQKAALRAQDV

```

Figura 7. Sequência deduzida da proteína ABC de *P. chrysosporium*.

Um resumo dos resultados obtidos na busca de domínios conservados, no banco de dados CDD v. 1.62, para a sequência da proteína ABC está mostrado na Figura 8 e Tabela 7. Diversos domínios conservados foram observados para a proteína em análise, todos envolvidos em sistemas de transporte ABC, incluindo dois domínios envolvidos no transporte de complexos ferro-sideróforo (FepC) e de íons metálicos (AbcC). Estudos devem ser

realizados para elucidar a função da proteína ABC em *P. chrysosporium* e desta forma permitir uma maior discussão do papel dos domínios conservados observados para esta proteína.

Na figura 8, pode-se observar que os domínios conservados encontram-se em duplicata na sequência da proteína ABC de *P. chrysosporium*. A primeira região de domínios

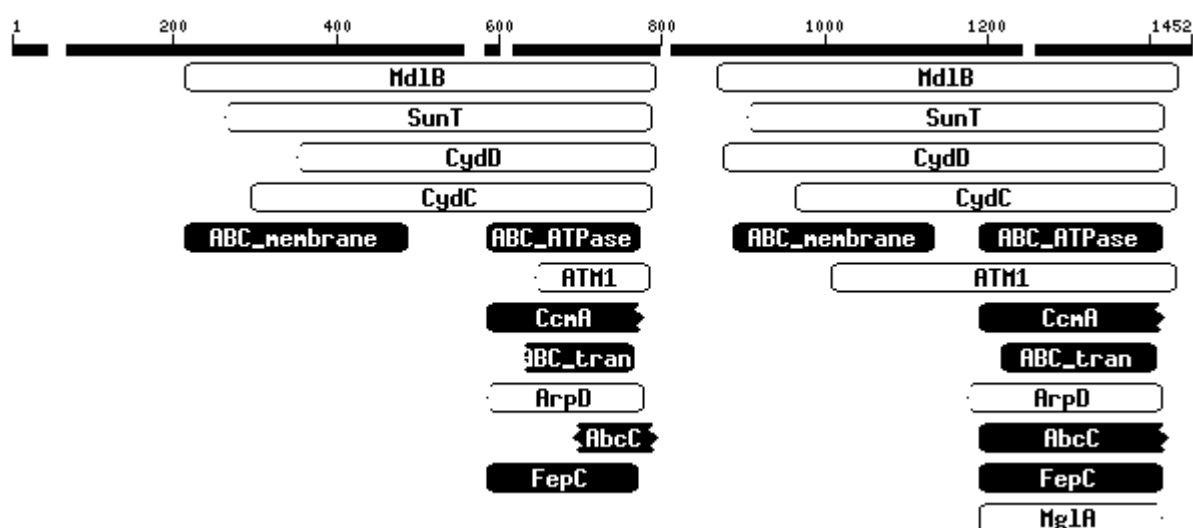


Figura 8. Resultado obtido no alinhamento da sequência deduzida da proteína ABC de *P. chrysosporium* com seqüências de domínios conservados depositadas no CDD v. 1.62.

compreende os resíduos de 1 a 800 e a segunda os resíduos de 801 a 1452. Ainda, verifica-se que a proteína do fungo possui os domínios duplicados identificados na Figura 8 e Tabela 7 como ABC-membrane e ABC-ATPase os quais correspondem, respectivamente, aos domínios/subunidades transmembrana e aos domínios/subunidades de ligação a nucleotídeos (NBD) característicos de proteínas transportadoras ABC. Como citado anteriormente os transportadores ABC em geral possuem uma estrutura comum que é formada, em geral, por dois domínios transmembrana e dois domínios de ligação ao DNA que podem estar em polipeptídeos separados ou podem estar fusionados em uma variedade de configurações.

De acordo com a distribuição dos domínios conservados mostrada na Figura 8, verifica-se que a estrutura da proteína ABC de *P. chrysosporium* é formada por 4 domínios fusionados como exemplificado na Figura 1, tipo C.

Tabela 7. Resultados obtidos na pesquisa de domínios conservados no banco de dados CDD v. 1.62 (*Conserved Domain Database*).

AA ^a	Identificação do CD ^b	Componente/Sistema	Função	Tamanho do CD ^{b,c}	% de AA ^a alinhados
1 a 800	MdlB	Permease e ATPase/ Sistema de transporte multidrogas tipo-ABC	Mecanismo de defesa	567	97,4
	SunT	Exportadores de bacterionina/lantibióticos/ Sistema de transporte tipo-ABC	Mecanismo de defesa	709	71,9
	CydD	ATPase e permease/ Sistema de transporte tipo-ABC envolvido na biossíntese do citocromo bd	Produção e conversão de energia, modificação pós-traducional, <i>turnover</i> de proteínas, chaperonas	559	77,3
	CydC	ATPase e permease fusionados/ Sistema de transporte tipo-ABC envolvido na biossíntese do citocromo bd	Produção e conversão de energia, modificação pós-traducional, <i>turnover</i> de proteínas, chaperonas	573	83,9
	ABC_ATPase	Domínio de ligação aos nucleotídeos (NBD)/ Sistema de transportadores ABC	Transporte de açúcares, íons, peptídios, complexos orgânicos complexos, etc	217	92,6
	ATM1	Permease e ATPase/ Sistema de transporte tipo-ABC envolvido na formação do <i>cluster</i> Fe-S	Modificação pós-traducional, <i>turnover</i> de proteínas, chaperonas	497	29,2
	CcmA	ATPase/ Sistema de transporte multidrogas tipo-ABC	Mecanismo de defesa	293	70,6
	ABC_membrane	Região transmembrana de transportador ABC/ Sistema de transportadores ABC	-	275	100,0
	ABC_tran	Transportador ABC/ Sistema de transportadores ABC	-	183	76,5
	ArpD	ATPase e permease/ Sist. de transporte de protease/lipase tipo-ABC	-	580	36,2
	AbcC	ATPase/ Sistema de transporte tipo-ABC de íons metálicos	Transporte e metabolismo de íons inorgânicos	339	31,6
	FepC	ATPase/ Sist. de transporte tipo-ABC de complexos Fe ⁺³ -sideróforo	Transporte e metabolismo de íons inorgânicos	258	79,5
801 a 1.452	MdlB	Permease e ATPase/ Sistema de transporte multidrogas tipo-ABC	Mecanismo de defesa	567	97,2
	SunT	Exportadores de bacterionina e lantibióticos/ Sistema de transporte tipo-ABC	Mecanismo de defesa	709	71,8
	CydD	ATPase e permease/ Sistema de transporte tipo-ABC envolvido na biossíntese do citocromo bd	Produção e conversão de energia, modificação pós-traducional, <i>turnover</i> de proteínas, chaperonas	559	95,2
	CydC	ATPase e permease fusionados/ Sistema de transporte tipo-ABC envolvido na biossíntese do citocromo bd	Produção e conversão de energia, modificação pós-traducional, <i>turnover</i> de proteínas, chaperonas	573	80,1
	ABC_ATPase	Domínio de ligação aos nucleotídeos (NBD)/ Sistema de transportadores ABC	Transporte de açúcares, íons, peptídios, complexos orgânicos complexos, etc	217	100,0
	ATM1	Permease e ATPase/ Sistema de transporte tipo-ABC envolvido na formação do <i>cluster</i> Fe-S	Modificação pós-traducional, <i>turnover</i> de proteínas, chaperonas	497	83,3
	CcmA	ATPase/ Sistema de transporte multidrogas tipo-ABC	Mecanismo de defesa	293	75,4
	ABC_membrane	Região transmembrana de transportador ABC/ Sistema de transportadores ABC	-	275	93,1
	ABC_tran	Transportador ABC/ Sistema de transportadores ABC	-	183	100,0
	ArpD	ATPase e permease/ Sist. de transporte de protease/lipase tipo-ABC	-	580	40,9
	AbcC	ATPase/ Sistema de transporte tipo-ABC de íons metálicos	Transporte e metabolismo de íons inorgânicos	339	68,1
	FepC	ATPase/ Sist. de transporte tipo-ABC de complexos Fe ⁺³ -sideróforo	Transporte e metabolismo de íons inorgânicos	258	86,0
	MglA	ATPase/ Sistema de transporte do tipo-ABC de açúcares	Transporte e metabolismo de carboidratos	500	44,2

a = Aminoácidos; b= *Conserved Domain*; c= número de aminoácidos (resíduos) do domínio conservado depositado no CDD

4. Conclusões

Embora, não tenha sido encontrada a sequência completa do gene que regula a biossíntese de sideróforos em *P. chrysosporium*, gene este homólogo aos genes *sreA*, *sreP*, *sre* e *urbs1*, a metodologia que envolveu a construção de um mini-banco, permitiu o isolamento de dois fragmentos de DNA genômico, o M3A2 e o P31E3, cujo alinhamento da sequência obtida para os mesmos permitiu verificar homologia com genes que codificam proteínas envolvidas no transporte e na síntese do sideróforo aerobactina de duas espécies diferentes de bactérias. A aerobactina é um sideróforo do tipo hidroxamato, sendo este tipo o mais comumente encontrado em fungos. Ainda, esta metodologia permitiu o isolamento do fragmento P14A1 o qual é parte de um gene que codifica uma proteína transportadora do tipo ABC, cujo envolvimento no transporte de complexos ferro-sideróforos têm sido amplamente reportado em diferentes espécies de bactérias.

O isolamento destes fragmentos, com base na homologia do transcrito 2.3, pode estar indicando a existência em *P. chrysosporium* de um sistema de captação de ferro que envolve a síntese de sideróforos e o transporte destes compostos complexados com ferro por proteínas do tipo ABC. A obtenção da sequência completa do gene e dos transcritos destes fragmentos é o primeiro passo para se estudar o papel destes genes no metabolismo do fungo em estudo.

Desta forma, buscando um maior entendimento do papel dos genes isolados nesta etapa do estudo, optou-se por isolar o transcrito completo do gene que codifica uma proteína ABC de *P. chrysosporium*. Proteínas transportadoras da família ABC estão envolvidas no transporte do complexo ferro-sideróforo em diversas espécies de bactérias. Ainda em levedura, transportadores ABC foram descritos como estando envolvidos na resposta celular do metabolismo intracelular do ferro. Entretanto, o papel do ferro na regulação da expressão dos genes de levedura que codificam as proteínas ABC não foi determinado.

Estudos adicionais devem ser feitos para elucidar o papel do ferro na regulação da expressão desta proteína ABC no metabolismo de *P. chrysosporium*.

CONCLUSÕES GERAIS

Como mostrado na Tabela 1, nas diferentes etapas deste estudo foram isolados fragmentos cuja sequência de aminoácidos deduzida alinharam com sequências de proteínas depositadas no GenBank envolvidas na síntese e no transporte de complexos ferro-sideróforos em bactérias, leveduras e outros organismos o que permite sugerir a existência de um mecanismo semelhante ao observado em bactérias no fungo *Phanerochaete chrysosporium* e ao observado em leveduras em *Lentinula edodes*. Ainda, foram isolados fragmentos que mostraram homologias com proteínas de rotas metabólicas envolvidas na manutenção de diferentes vias dependentes de ferro. Também fragmentos que codificam lignina peroxidases, indicando que o ferro deva ter um papel importante na regulação da expressão de genes que codificam enzimas e compostos envolvidos nos processos de degradação da madeira em fungos ligninolíticos.

Tabela 1. Resumo dos fragmentos isolados neste estudo cuja sequência de aminoácidos deduzida alinhou com sequências de proteínas envolvidas em vias metabólicas dependentes de ferro ou nos processos de degradação da madeira.

Função	Espécie de Fungo	Fragmentos (Capítulo)	Sistema /Organismo
Síntese de sideróforos	<i>P. chrysosporium</i>	<u>A4.10e</u> (2); <u>1.8</u> , <u>2.3</u> (3); P31E3 (5)	Bactérias
Transporte de ferro, outros metais, etc.	<i>P. chrysosporium</i>	<u>C5.4e</u> , <u>C5.9e</u> , <u>C5.26d</u> , 13e, C5.12e (2); <u>1.2</u> , <u>1.11</u> (3); 6.40, 15.6 (4); M3A2, P14A1 (5)	Bactérias
	<i>L. edodes</i>	<u>3.28</u> (3)	Levedura
Armazenagem de ferro	<i>P. chrysosporium</i>	C5.18a (2); <u>1.2</u> (3); 6.40 (4)	Bactérias
Metabolismo do ferro	<i>P. chrysosporium</i>	<u>17.6</u> (4)	Bactérias
		<u>A2.16a</u> (2); P14A1 (5)	Levedura
		<u>A14.16f</u> (2); <u>17.6</u> (4)	Humanos
Degradação da madeira	<i>P. chrysosporium</i>	<u>1.1</u> , <u>A14.16f</u> (2); 16.18, 16.21 (4)	Fungos
	<i>L. edodes</i>	4.53 (3)	Fungos

Sublinhado = expressão regulada por ferro confirmada

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akhtar, M., Blanchette, R.A., Kirk, T.K. (1997) Fungal delignification and biomechanical pulping of wood. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology* 57: 16-195.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402.
- An Z., Mei B., Yuan W.M., Leong A.S. (1997a) The distal GATA sequences of the *sid1* promoter of *Ustilago maydis* mediate iron repression of siderophore production and interact directly with Urbs1, a GATA family transcription factor. *EMBO J* 16: 1742-1750.
- An Z., Zhao Q., Mcevoy J., Yuan W.M., Markley J.L., Leong A.S. (1997b) The second finger of Urbs1 is required for iron-mediated repression of *sid1* in *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 5882-5887.
- Ander P., Marzullo L. (1997) Sugar oxidoreductases and veratryl alcohol oxidase as related to lignin degradation. *J. Biotechnol.* 53: 115-131.
- Andrews N., Fleming M., Gunshin H. (1999) Iron transport across biologic membranes. *Nutri. Rev.* 57: 114-123.
- Angerer A., Klupp B., Braun V. (1992) Iron transport systems of *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* 174: 1378-1387.
- Appleyard V.C.L., Unkles S.E., Legg M., Kinghorn J.R. (1995) Secondary metabolite production in filamentous fungi displayed. *Mol. Gen. Genet.* 247: 338-342.
- Assmann EM, Ottoboni L.M.M., Ferraz A., Rodríguez J., De Mello M.P. (2003) Iron-Responsive genes of *Phanerochaete chrysosporium* isolated by Differential Display Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction. *Environmental Microbiology* 5: 777-786.
- Baclocchi E., Bietti M., Gerini M.F., Lanzaunga O. (2002) The mediation of veratryl alcohol in oxidations promoted by lignin peroxidase: the lifetime of veratryl alcohol radical cation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 293: 832-835.
- Bagg, A., Neillands J.B. (1987) Molecular mechanism of regulation of siderophore-mediated iron assimilation. *Microbiol. Rev.* 51: 509-518.
- Banci L. (1997) Structural properties of peroxidases. *J. Biotechnol.* 53: 253-263.

- Bauer B.E, Wolfger H., Kuchler K. (1999) Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress pleiotropic drug and heavy metal resistance. *Biochem. Biophys. Acta* 1461: 217-236.
- Bearden S.W., Staggs T.M., Perry R.D. (1998) An ABC transporter system of *Yersinia pestis* allows utilization of chelated iron by *Escherichia coli* SAB11. *J. Bacteriol.* 180: 1135-1147.
- Bending G.D., Friloux M., Walker A. (2002) Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential. *FEMS Microbiol. Lett.* 212: 59-63.
- Björnberg O., Jordan D.B., Palfey B.A., Jensen K.F. (2001) Dihydrooxonate is a substrate of dihydroorotate dehydrogenase (DHOD) providing evidence for involvement of cysteine and serine residues in base catalysis. *Arch. Biochem. Biophys.* 391: 286-294.
- Blaiseau P-L., Lesuisse E., Camadro J-M. (2001) Aft2p, a novel iron-regulated transcription activator that modulates, with Aft1p, intracellular iron use and resistance to oxidative stress in yeast. *J. Biol. Chem.* 276: 34221-34226.
- Blanchete R.A. (1991) Delignification by wood-decay fungi. *Ann. Rev. Phytopathol.* 29: 381-398.
- Blanchette R.A., Krueger E.W., Haight J.E., Akhtar M., Akin D.E. (1997) Cell wall alterations in loblolly pine wood decayed by white-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*. *J. Microbiol.* 53: 203-213.
- Braun V., Braun M. (2002a) Active transport of iron and siderophore antibiotics. *Curr. Opin. Microbiol.* 5: 194-201.
- Braun V., Braun M. (2002b) Iron transport and signaling in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 529: 78-85.
- Braun V., Killmann H. (1999) Bacterial solutions to the iron-supply problem. *TIBS* 24: 104-109.
- Broda P., Birch P.R.J., Brooks P.R., Sims P.F.G. (1995) Lignocellulose degradation by *Phanerochaete chrysosporium*: gene families and gene expression for a complex process. *Mol. Microbiol.* 19: 923-932.
- Burge C., Karlin S. (1997) Prediction of complete gene structure in human genomic DNA. *J. Mol. Biol.* 268: 78-94.
- Burge C.B., Karlin S. (1998) Finding the genes in genomic DNA. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8: 346-354.

- Calderón J., Olvera L., Martínez L.M., Dávila G. (1997) A *Neurospora crassa* mutant altered in the regulation of L-amino acid oxidase. *Microbiol. 143*: 1969-1974.
- Calvente V., de Orellano M.E., Sansone G., Benuzzi D., Sanz de Tosetti M.I. (2001) A simple agar plate assay for screening siderophore producer yeasts. *J. Microbiol. Methods 47*: 273-279.
- Cameron M.D., Aust S.D. (2001) Cellobiose dehydrogenase-an extracellular fungal flavocytochrome. *Enzyme Microb. Technol. 28*: 129-138.
- Cameron M.D., Timofeevski S., Aust S.D. (2000) Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol. 54*: 751-758.
- Cereghino J.L., Marcusson E.G., Emr S.D. (1995) The cytoplasmic tail domain of the vacuolar protein sorting receptor Vps10p and a subset of VPS gene products regulate receptor stability, function, and localization. *Mol. Biol. Cell 6*:1089-1102.
- Chiang C.-S., Liaw G.-J. (2000) A missence mutation in the nuclear gene coding for the mitochondrial aspartyl-tRNA synthetase suppresses a mitochondrial tRNA^{Asp} mutation. *Nucl. Acids Res. 28*: 1542-1547.
- Cockayne A., Hill P.J., Powell N.B.L., Bishop K., Sims C., Williams P. (1998) Molecular cloning of a 32-kilodalton lipoprotein component of a novel iron-regulated *Staphylococcus epidermitis* ABC transporter. *Infect. Immun. 66*: 3767-3774.
- Cohen A., Nelson H., Nelson N. (2000) The family of *SMF* metal ion transporters in yeast cells. *J Biol. Chem. 275*: 33388-33394.
- Conesa A., Punt P.J., Van Den Hondel C.A. (2002) Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. *J. Biotechnol. 93*: 143-158.
- Corpet F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res. 16*: 10881-10890.
- Crosa J.H. (1997) Signal transduction and transcriptional and posttranscriptional control of iron-regulated genes in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61*: 319-336.
- Crosa J.H., Walsh C.T. (2002) Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66*: 223-249.
- Crowling E.B. (1961) Comparative biochemistry of the decay of sweetgum sapwood by white-rot and brown-rot fungi. Tech Bull 1258. USDA Washington, DC, p.79.

- Cui Z., Hirata D., Tsuchiya E., Osada H., Miyakawa T. (1996) The multidrug resistance-associated protein (MRP) subfamily (Yrs1/Yor1) of *Saccharomyces cerevisiae* is important for the tolerance to a broad range of organic anions. *J. Biol. Chem.* 271: 14612-14716.
- D' Souza T.M., Boominathan K., Reddy C.A. (1996) Isolation of laccase gene-specific sequences from white rot and brown rot fungi by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3739-3744.
- Dancis A., Klausner R.D., Hinnebusch A.G., Barriocanal J.G. (1990) Genetic evidence that ferric reductase is required for iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 10: 2294-2301.
- Daniel G. (1994) Use of electron microscopy for aiding our understanding of wood biodegradation. *FEMS Microbiol. Rev.* 13:199-233.
- De Waard M.A. (1997) Significance of ABC transporters in fungicide sensitivity and resistance. *Pestic. Sci.* 51: 271-275.
- Dix D., Bridgham J., Broderius M., Eide D. (1997) Characterization of the FET4 protein of yeast. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 11770-11777.
- Dubrac S., Touati D. (2002) Fur-mediated transcriptional and post-transcriptional regulation of FeSOD expression in *Escherichia coli*. *Microbiology* 148: 147-156.
- Dugourd D., Martin C., Rioux C.R., Jacques M., Harel J. (1999) Characterization of a periplasmic ATP-binding cassette iron import system of *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae*. *J. Bacteriol.* 181: 6948-6957.
- Duran R., Deschler C., Precigou S., Goulas P. (2002) Degradation of chlorophenols by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of 3,4-dichlorophenol on extracellular peroxidase activities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 284-288.
- Enoki A., Itakura S., Tanaka H. (1997) The involvement of extracellular substances for reducing molecular oxygen to hydroxyl radical and ferric iron to ferrous iron in wood degradation by wood decay fungi. *J. Biotechnol.* 53: 265-272.
- Epping E.A., Moye-Rowley W.S. (2002) Identification of interdependent signals required for anterograde traffic of the ATP-binding cassette transporter protein Yor1p. *J. Biol. Chem.* 277: 34860-34869.
- Eriksson K.-E.L., Blachette R.A., Ander P. (1990) Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components, Springer Verlag, Heidelberg, 407p.

- Fekete F.A., Chandhoke V., Jellison J. (1989) Iron-binding compounds produced by wood-decaying basidiomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 2720-2722.
- Feng B., Xiao X., Marzluf G.A. (1993) Recognition of specific nucleotide bases and cooperative DNA binding by the *trans*-acting nitrogen regulatory protein NIT2 of *Neurospora crassa*. *Nucl. Acids Res.* 21: 3989-3996.
- Ferraz A., Parra C., Freer J., Baeza J., Rodríguez J. (2001) Occurrence of iron-reducing compounds in biodelignified “palo podrido” wood samples. *International Biodeterioration & Biodegradation* 47: 203-208.
- Fetherston J.D., Bertolino V.J., Perry R.D. (1999) YbtP and YbtQ: two ABC transporters required for iron uptake in *Yersinia pestis*. *Mol. Microbiol.* 32: 289-299.
- Forrester I.T., Grabski A.C., Mishra C., Kelly B.D., Strickland W.N., Leatham G.F., Burgess R.R. (1990) Characteristics and N-terminal amino acid sequence of a manganese peroxidase purified from *Lentinula edodes* cultures grown on a commercial wood substrate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33: 359-365.
- Frohman M.A., Dush M.K., Martin G.R. (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8998-9002.
- Gampel A., Tzagoloff A. (1989) Homology of aspartyl- and lysyl-tRNA synthetases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6023-6027.
- Gaskell J., Dieperink, E., Cullen D. (1991) Genomic organization of lignin peroxidase genes of *Phanerochaete chrysosporium*. *Nucleic Acids Res.* 19: 599-603.
- Gelpke M.D.S., Lee J., Gold M.H. (2002) Lignin peroxidase oxidation of veratryl alcohol: effects of the mutants H82A, Q222A, W171A, and F267L. *Biochemistry* 41: 3498-3506.
- Georgatsou E., Alexandraki D. (1994) Two distinctly regulated genes are required for ferric reduction, the first step of iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 14: 3065-3073.
- Gerischer U. (2002) Specific and global regulation of genes associated with the degradation of aromatic compounds in bacteria. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 4: 111-121.
- Gettemy J.M., Ma B., Alic M., Gold, M.H. (1998) Reverse transcription-PCR analysis of the regulation of the manganese peroxidase gene family. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 569-574.

- Geueke B., Hummel W. (2002) A new bacterial L-amino acid oxidase with a broad substrate specificity: purification and characterization. *Enzyme Microb. Technol* 31: 77-87.
- Gold M.H., Alic M. (1993) Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiol. Rev.* 57: 605-622.
- Gong, S., Bearden, S.W., Geoffroy, V.A., Fetherston, J.D., Perry, R.D. (2001) Characterization of the *Yersinia pestis* Yfu ABC inorganic iron transport system. *Infect Immun* 67: 2829-2837.
- Goodell, B. (2003) ACS Symposium Series 845: Brown-Rot Fungal Degradation of Wood: Our Evolving View. In *Wood deterioration and preservation: advances in our changing world*. Goodell B., Nicholas D.D., Schultz T.P. (Eds.). Portland: Oxford University Press, pp. 97-118.
- Goodell, B., Jellison, J., Lui, J., Daniel, G., Paszcynski, A., Fekete, F., Krishnamurthy, S., Jun, L., and Xu, G. (1997) Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolated from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood. *J. Biotechnol.* 53: 133-162.
- Groeger W., Köster W. (1998) Transmembrane topology of the two FhuB domains representing the hydrophobic components of bacterial ABC transporters involved in uptake of siderophores, haem and vitamin B₁₂. *Microbiology* 144: 2759-2769.
- Guillén F., Muñoz C., Gómez-Toribio V., Martínez A.T., Martínez M.J. (2000) Oxygen activation during oxidation of methoxyhydroquinones by laccase from *Pleurotus eryngii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 170-175.
- Haas H., Angermayr K., and Stöffler G. (1997) Molecular analysis of a *Penicillium chrysogenum* GATA factor encoding gene (sreP) exhibiting significant homology to the *Ustilago maydis* urbs1 gene. *Gene* 184: 33-37.
- Haas H., Zadra I., Stöffler G., Angermayr K. (1999) The *Aspergillus nidulans* GATA factor SREA is involved in regulation of siderophore biosynthesis and control of iron uptake. *J. Biol. Chem.* 274: 4613-4619.
- Hammel K.E. (1997) Fungal degradation of lignin. In: Cadisch G. and Giller K.E. (Eds.), *Plant Litter Quality and Decomposition*. CAB International, pp. 33-45.
- Hammel K.E., Jensen K.A. Jr., Mozuch M.D., Landucci L.L., Tien M., Pease E.A. (1993) Ligninolysis by a purified lignin peroxidase. *J. Biol. Chem.* 268: 12274-12281.

- Hammel K.E., Kapich A.N., Jensen K.A.Jr., Ryan Z.C. (2002) Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. *Enzyme Microbial. Technol.* 30: 445-453.
- Hamood A.N., Colmer J.A., Ochsner U.A., Vasil M.L. (1996) Isolation and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* gene, *ptxR*, which positively regulates exotoxin A production. *Mol. Microbiol.* 21: 97-110.
- Hantke K. (2001) Iron and metal regulation in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 4: 171-177.
- Harmsen M.C., Schuren F.H., Moukha S.M., van Zuilien C.M. Punt, P.J. Wessels, J.G.H. (1992) Sequence analysis of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes from the basidiomycetes *Schizophyllum commune*, *Phanerochaete chrysosporium* and *Agaricus bisporus*. *Curr. Genet.* 22: 447-454.
- Harrison K.A., Marzluf G.A. (2002) Characterization of DNA binding and the cysteine rich region of SRE, a GATA factor in *Neurospora crassa* involved in siderophore synthesis. *Biochemistry* 41: 15288-15295.
- Hartwig R.C., Loepper R.H. (1993) Evaluation of soil iron. In: Barton L.L. and Hemming B.C. (Eds.), Iron Chelation in Plants and Soil Microorganisms. Academic Press, NY, pp 465-482.
- Henriksson G., Zhang L., Li J., Ljungquist P., Reitberger T., Pettersson G., Johansson G. (2000) Is cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium* a lignin degrading enzyme? *Biochim. Biophys. Acta* 1480: 83-91.
- Hernández-Macedo M.L., Assmann E.M., Ferraz A., Rodríguez J., Ottoboni L.M.M, De Mello M.P. (submitted) Proteins induced by iron-starvation on white-rot fungi correlate to the production of iron-chelating compounds. *J. Gen. Appl. Microbiol.*
- Hernández-Macedo M.L., Ferraz A., Rodríguez J., Ottoboni L.M., De Mello M.P. (2002) Iron-regulated proteins in *Phanerochaete chrysosporium* and *Lentinula edodes*: differential analysis by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis profiles. *Electrophoresis* 23: 655-661.
- Heymann P., Ernest J.F., Winkelman G. (2000a) Identification of a fungal triacetylfusarine C siderophore transporter gene (*TAF1*) in *Saccharomyces cerevisiae* as a member of the major facilitator superfamily. *BioMetals* 12: 301-306.
- Heymann P., Ernest J.F., Winkelman G. (2000b) Identification and substrate specificity of a ferrichrome-type siderophore transporter (Arn1p) in *Saccharomyces cerevisiae*” *FEMS Microbiol. Lett.* 186: 221-227.

- Hirai H., Itoh T., Kondo R., Sakai K., Nishida T. (2002) Intracellular ferrireductase involved in Mn(IV)-reducing enzyme system to supply Mn(II) for lignin biodegradation by white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* YK-624. *Enzyme Microb. Technol.* 30: 467-473.
- Hoisington D. (1993) Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. 2nd. ed., México, DF: CIMMYT.
- Horsburgh M.J., Ingham E., Foster S.J. (2001) In *Staphylococcus aureus*, fur is an interactive regulator with PerR, contributes to virulence, and Is necessary for oxidative stress resistance through positive regulation of catalase and iron homeostasis. *J. Bacteriol.* 183: 468-475.
- Howard, D.H. (1999) Acquisition, transport, and storage of iron by pathogenic fungi. *Clinical Microbiol. Rev.* 12: 394-404.
- Huschka H.G., Winkelmann G. (1989) Iron limitation and its effect on membrane proteins and siderophore transport in *Neurospora crassa*. *Biol. Met.* 2: 108-113.
- Ichinose H., Wariishi H., Tanaka H. (2002) Molecular analysis of arylalcohol dehydrogenase of *Coriolus versicolor* expressed against exogenous addition of dibenzothiophene derivatives. *J. Basic Microbiol.* 42: 179-185.
- Iimura Y., Tatsumi K. (1997) Isolation of mRNAs induced by a hazardous chemical in white-rot fungus, *Coriolus versicolor*, by differential display. *FEBS Lett.* 412: 370-374.
- Ivanova A.V., Ivanov S.V. (2002) Differential display analysis of gene expression in yeast. *Cell. Mol. Life Sci.* 59: 1241-1245.
- Janse B.J.H., Gaskell J., Akthar M., Cullen D. (1998) Expression of *Phanerochaete chrysosporium* gene encoding lignin peroxidases, manganese peroxidases, and glyoxal oxidase in wood. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3536-3538.
- Jellison, J., Chandhoke, V., Goodell, B., Fekete, F.A. (1991) The isolation and immunolocalization of iron-binding compounds produced by *Gloeophyllum trabeum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35: 805- 809.
- Jensen, K. A. JR., Houtman, C. J., Ryan, Z. C., and Hammel, K. E. (2001) Pathways for extracellular Fenton chemistry in the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2705-2711.
- Johjima T., Itoh N., Kabuto M., Tokimura F., Nakagawa T., Wariishi H., Tanaka H. (1999) Direct interaction of lignin and lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 1989-1994.

- Kammler M., Schön C., Hantke K. (1993) Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175: 6212-6219.
- Katoh H., Hagino N., Grossman A.R., Ogawa T. (2001) Genes essential to iron transport in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* 183: 2779-2784.
- Katzmann D.J., Epping E.A., Moye-Rowley W.S. (1999) Mutational disruption of plasma membrane trafficking of *Saccharomyces cerevisiae* Yor1p, a homologue of mammalian multidrug resistance protein. *Mol. Cell. Biol.* 19: 2998-3009.
- Katzmann D.J., Hallstrom T.C., Voet M., Wysock W., Golin J., Volckaert G., Moye-Rowley W.S. (1995) Expression of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene (*YOR1*) is required for oligomycin resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 15: 6875-6883.
- Kim Y., Yun C.-W., Philpott C.C. (2002) Ferrichrome induces endosome to plasma membrane cycling of the ferrichrome transporter, Arn1p, in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 21: 3632-3642.
- Kirk T.K., Farrell R.L. (1987) Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin. *Annu. Rev. Microbiol.* 41: 456-506.
- Kosman D.J. (2003) Molecular mechanisms of iron uptake in fungi. *Mol. Microbiol.* 47: 1185-1197.
- Kullmann S.W., Matsumura F. (1997) identification of a novel cytochrome P-450 gene the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2741-2746.
- Kurihara H., Wariishi H., Tanaka H. (2002) Chemical stress-responsive genes from the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* exposed to dibenzo-p-dioxin. *FEMS Microbiol. Lett.* 212: 217-220.
- Lamar R.T., Schenike B., Vanden Wymelenberg A., Stewart P., Dietrich D.M., Cullen D. (1995) Quantification of fungal mRNAs in complex substrates by reverse transcription PCR and its application to *Phanerochaete chrysosporium*-colonized soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2122-2126.
- Lehrach H., Drmanac R., Hoheisel J.D., Larin Z., Lennon G., Monaco A.P., Nizetic D., Zehetner G., Poustka A. (1990) Hybridization fingerprinting in genome mapping and sequencing. In *Genome Analysis: Genetic and Physical Mapping* (Ed. Davis K.E., Tilghman S.) pp39-81, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

- Leong S.A., Winkelmann G. (1998) Molecular Biology of Iron Transport in Fungi. *Met Ions Biol Syst* 35: 147-186.
- Lesuisse E., Blaiseau P.L., Dancis A., Camadro J.M. (2001) Siderophore uptake and use by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 147: 289-298.
- Leung G.S.W., Zhang M., Xie W.J., Kwan H.S. (2000) Identification by RNA fingerprinting of genes differentially expressed during the development of the basidiomycete *Lentinula edodes*. *Mol. Gen. Genet.* 262: 977-990.
- Li D., Alic M., Brown J.A., Gold M.H. (1995) Regulation of manganese peroxidase gene transcription by hydrogen peroxide, chemical stress, and molecular oxygen. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 341-345.
- Liang P. (1998) Factors ensuring successful use of differential display. *Methods* 16: 361-364.
- Liang P., Averboukh L., Pardee A.B. (1993) Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucl. Acids Res.* 21: 3269-3275.
- Liang P., Pardee A.B. (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257: 967-971.
- Ling R., Colón E., Dahmus M.E., Callis J. (2000) Histidine-tagged ubiquitin substitutes for wild-type ubiquitin in *Saccharomyces cerevisiae* and facilitates isolation and identification of *in vivo* substrates of the ubiquitin pathway. *Analytical Biochemistry* 282: 54-64.
- Löffler M., Becker C., Wegerle E., Schuster G. (1996) Catalytic enzyme histochemistry and biochemical analysis of dihydroorotate dehydrogenase/oxidase and succinate dehydrogenase in mammalian tissues, cells and mitochondria. *Histochem. Cell. Biol.* 105: 119-128.
- Logemann J., Fritsch E.F., Willmitzer L. (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Analytical Biochemistry* 163:16-20.
- Machuca A., Aoyama H., Duran N. (1999) Isolation and partial characterization of an extracellular low-molecular mass component with high phenoloxidase activity from *Thermoascus aurantiacus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251: 20-26.
- Machuca A., Milagres A.M.F. (2003) Use of CAS-agar plate modified to study the effect of different variables on the siderophore production by *Aspergillus*. *Lett, Appl. Microbiol.* 36: 177-181.

- Mademidis A., Killmann H., Kraas W., Flechsler I., Jung G., Braun V. (1997) ATP-dependent ferric hydroxamate transport system in *Escherichia coli*: periplasmic FhuD interacts with a periplasmic and with a transmembrane/cytoplasmic region of the integral membrane protein FhuB, as revealed by competitive peptide mapping. *Mol. Microbiol.* 26: 1109-1123.
- Mahe B., Masclaux C., Rauscher L., Enard C., Expert D. (1995) Differential expression of two siderophore-dependent iron-acquisition pathways in *Erwinia chrysanthemi* 3937: characterization of a novel ferrisiderophore permease of the ABC transporter family. *Mol. Microbiol.* 18: 33-43.
- Mäkelä M., Galkin S., Hatakka A., Lundell T. (2002) production of organic acids and oxalate decarboxylase in lignin-degrading white rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology* 30: 542-549.
- Marcusson E.G., Horazdovsky B.F., Cereghino J.L., Gharakhanian E., Emr S.D. (1994) The sorting receptor for yeast vacuolar carboxypeptidase Y is encoded by the VPS10 gene. *Cell* 77: 579-586
- Martínez A.T. (2002) Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enzyme Microb. Technol.* 30: 425-444.
- Martinez J.L., Herrero M., De Lorenzo V. (1994) The organization of intercistronic regions of the aerobactin operon of pColV-K30 may account for the differential expression of the *iucABCD* and *iutA* genes. *J. Mol. Biol.* 238: 288-293.
- Martins L.J., Jensen L.T., Simons J.R., Keller G.L., Winge D.R. (1998) Metalloregulation of *FRE1* and *FRE2* homologs in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 273: 23716-23721.
- Mason M.G., Ball A.S., Reeder B.J., Silkstone G., Nicholls P., Wilson M.T. (2001) extracellular heme peroxidases in Actinomycetes: a case of mistaken identity. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4512-4519.
- Mason M.G., Wilson M.T., Ball A.S., Nicholls P. (2002) Oxygen reaction by cellobiose oxidoreductase: the role of the haem group. *FEBS Lett.* 518: 29-32.
- Mei B., Budde A.D., Leong S.A. (1993) Sid1, a gene initiating siderophore biosynthesis in *Ustilago maydis*: molecular characterization, regulation by iron, and role in phytopathogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 903-907.

- Mester T., Ambert-Balay K., Ciofi-Baffoni S., Banci L., Jones A.D., Tien M. (2001) Oxidation of a tetrameric nonphenolic lignin model compound by lignin peroxidase. *J. Biol. Chem.* 276: 22985-22990.
- Milagres A.M.F., Arantes V., Medeiros C.L., Machuca A. (2002) Production of metal chelating compounds by white and brown-rot fungi and their comparative abilities for pulp bleaching. *Enzyme Microb. Technol.* 30: 562-565.
- Milagres A.M.F., Machuca A., Napoleao D. (1999) Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. *J. Microbiol. Meth.* 37: 1-6.
- Minussi R.C., De Moraes S.G., Pastore G.M., Duran N. (2001) Biodecolorization screening of synthetic dyes by four white-rot fungi in a solid medium: possible role of siderophores. *Lett Appl Microbiol* 33: 21-25.
- Miura S., Zou W., Ueda M., Tanaka A. (2000) Screening of genes involved in isooctane tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by using mRNA differential display. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4883-4889.
- Moeck G.S., Coulton J.W. (1998) TonB-dependent iron acquisition: mechanisms of siderophore-mediated active transport. *Mol. Microbiol.* 28: 675-681.
- Morrissey J.A., Cockayne A., Hill P.J., Williams P. (2000) Molecular cloning and analysis of a putative siderophore ABC transporter from *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 68: 6281-6288.
- Nei M., Rogozin I.B., Piontkivska H. (2000) Purifying selection and birth-and-death evolution in the ubiquitin gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 10866-10871.
- Neilands J.B. (1995) Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* 270: 26723-26726.
- Omichinski J.G., Clore G.M., Schaad O., Felsenfeld G., Trainor C., Appella E., Stahl S.J., Gronenborn A.M. (1993) NMR structure of a specific DNA complex of Zn-containing DNA binding domain GATA-1. *Science* 261: 438-446.
- Palfey B.A., Bjornberg O., Jensen K.F. (2001) Insight into the chemistry of flavin reduction and oxidation in *Escherichia coli* dihydroorotate dehydrogenase obtained by rapid reaction studies. *Biochemistry* 40: 4381-4390.

- Palmiter R.D., Cole T.B., Quaide C.J., Findley S.D. (1996) ZnT3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14934-14939.
- Parra, C., Rodriguez, J., Baeza, J., Freer, J., and Duran, N. (1998a) Iron-binding catechols oxidating lignin and chlorolignin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 25: 399-402.
- Parra, C., Santiago, M. F., Rodriguez, J., and Duran, N. (1998b) Hydroxamate iron complex with phenoloxidase activity acting on lignin and chlorolignins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249: 719-722.
- Paszczynski A., Crawford R., Blanchete R.A. (1988) Delignification of wood chips and pulps using natural and synthetic porphyrins: models of fungal decay. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 62-68.
- Paszczynski A., Crawford R., Funk D., Goodell B. (1999) De novo synthesis of 4,5-dimethoxycatechol and 2, 5-dimethoxyhydroquinone by the brown rot fungus *Gloeophyllum trabeum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 674-679.
- Pflugmacher U., Averhorr B., Gottschalk G. (1996) Cloning, sequencing, and expression of Isopropylbenzene degradation genes from *Pseudomonas* sp. strain JR1: identification of Isopropylbenzene dioxygenase that mediates trichloroethene oxidation." *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3967-3977.
- Philpott C.C., Protchenko O., Kim Y.W., Boretsky Y., Shakoury-Elizeh M. (2002) the response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*: expression of siderophore-based systems of iron uptake. *Biochem. Soc. Trans.* 30: 698-702.
- Qian Y., Goodell B., Felix C.C. (2002) The effect of low molecular weight chelators on iron chelation and free radical generation as studied by ESR measurement. *Chemosphere* 48: 21-28.
- Raíces M., Montesino R., Cremata J., García B., Perdomo W., Szabó I., Henriksson G., Hallberg B.M., Pettersson G., Johansson G. (2002) Cellobiose quinone oxidoreductase from the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* is produced by intracellular proteolysis of cellobiose dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* 1576: 15-22.
- Raymond K.N., Dertz E.A., Kim S.S. (2003) Enterobactin: An archetype for microbial iron transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 3584-3588.

- Reddy G.V.B., Gelpke M.D.S., Gold M.H. (1998) Degradation of 2,4,6-trichlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*: involvement of reductive dechlorination. *J. Bacteriol.* 180: 5159-5164.
- Rodríguez J., Contreras D., Parra C., Freer J., Baeza J., Durán N. (1999) Pulp mill effluent treatment by Fenton-type reactions catalized by iron complexes. *Wat. Sci. Tech.* 40: 351-355.
- Rodríguez J., Ferraz A., De Mello M.P. (2003) ACS Symposium Series 845: Role of Metals in Wood Biodegradation. In *Wood deterioration and preservation: advances in our changing world*. Goodell B., Nicholas D.D., Schultz T.P. (Eds.). Portland: Oxford University Press, pp. 154-174.
- Rodríguez J., Osés R., Parra C., Freer J., Baeza J. (1997) Siderophore Production by Lignin Degrading Fungi. *Proceedings of the Symposium of Chemistry of Lignins and Other Wood Components (Curitiba, Brazil)* 5: 601-604.
- Rutherford J.C., Jaron S., Ray E., Brown P.O., Winge D.R. (2001) A second iron-regulatory system in yeast independent of Aft1p. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 14322-14327.
- Sarkanen S., Razal R.A., Piccariello T., Yamamoto E., Lewis N.G. (1991) Lignin peroxidase: toward a clarification of its role *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 266: 3636-3643.
- Scazzocchio C. (2000) The fungal GATA factors. *Curr. Opin. Lett.* 3: 126-131.
- Schaefer B.C. (1995) Revolutions in Rapid Amplification of cDNA Ends: new strategies for polymerase chains reaction cloning of full-length cDNA ends. *Anal. Biochem.* 227: 255-273.
- Scheel T., Höfer M., Ludwig S., Hölker U. (2000) Differential expression of manganese peroxidase and laccase in white-rot fungi in the presence of manganese or aromatic compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 686-691.
- Schell M.A. (1993) Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 597-626.
- Schick Zapanta L., Tien M. (1997) The roles of veratryl alcohol and oxalate in fungal lignin degradation. *J. Biotechnol.* 53: 93-102.
- Schwyn B., Neilands J.B. (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem* 160: 46-56.
- Shin S.H., Lim Y., Lee S.E., Yang N.W., Rhee J.H. (2001) CAS agar diffusion assay for the measurement of siderophores in biological fluids. *J. Microbiol. Methods* 44: 89-95.

- Sokolovsky V., Kaldenhoff R., Ricci M., Russo V.E.A. (1995) Fast and reliable mini-prep RNA extraction from *Neurospora crassa*. [WWW document]. URL www.fgsc.net/fgn37/sokol.html.
- Stack J.H., Horazdovsky B., Emr S.D. (1995) Receptor-mediated protein sorting to the vacuole in yeast: roles for a protein kinase, a lipid kinase and GTP-binding proteins. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 11: 1-33.
- Stein J., Liang P. (2002) Differential display technology: a general guide. *Cell. Mol. Life Sci.* 59: 1235-1240.
- Stintzi A., Johnson Z., Stonehouse M., Ochsner U., Meyer J.-M., Vasil M.L., Poole K. (1999) The *pvc* gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa*: Role in synthesis of the pyoverdine chromophore and regulation by PtxR and PvdS. *J. Bacteriol.* 181: 4118-4124.
- Stewart P., Cullen D. Organization and differential regulation of a cluster of lignin peroxidase genes of *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* 181: 3427-3432.
- Szczyepka M.S., Wemmie J.A., Moye-Rowley W.S., Thiele D.J. (1994) A yeast metal resistance protein similar to human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and multidrug resistance-associated protein. *J. Biol. Chem.* 269: 22853-22857.
- Tanaka H., Itakura S., Enoki A. (1998) Hydroxyl radical generation by an extracellular low-molecular-weight substance and phenol oxidase activity during wood degradation by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*. *J. Biotechnol.* 75: 57-70.
- Tanaka H., Itakura S., Hirano T., Enoki A. (1996) An extracellular substance from the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* for reducing molecular oxygen and ferric iron. *Holzforschung* 50: 541-548.
- Tanaka, H., Fuse G., Enoki A. (1991) An extracellular H₂O₂-producing and H₂O₂-reducing glycopeptide preparation from the lignin-degrading white-rot fungus, *Irpex lacteus*. *Mokuzai Gakkaishi* 37: 986-988.
- Tornberg K., Olsson S. (2002) Detection of hydroxyl radicals produced by wood-decomposing fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.* 40: 13-20.
- Tuttle M.S., Radisky D., Li L., Kaplan J. (2003) A dominant allele of *PDR1* alters transition metal resistance in yeast. *J. Biol. Chem.* 278: 1273-1280.

- Van Burik J.-A.H., Schreckhise R.W., White T.C., Bowden R.A., Myerson D. (1998) Comparison of six extraction techniques for isolation of DNA from filamentous fungi. *Medical Mycology* 36: 299-303.
- Van Vliet A.H.M., Ketley J.M., Park S.F., Penn C.W. (2002) The role of iron in *Campylobacter* gene regulation, metabolism and oxidative stress defense. *FEMS Microbiol. Rev.* 26: 173-186.
- Vasil M.L., Ochsner U.A., Johnson Z., Colmer J.A., Hamood A.N. (1998) The Fur-regulated gene encoding the alternative sigma factor PvdS is required for iron-dependent expression of the LysR-type regulator PtxR in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 180: 6784-6788.
- Venturi V., Weisbeek P., Koster M. (1995) Gene regulation of siderophore-mediated iron acquisition in *Pseudomonas*: not only the Fur repressor. *Mol. Microbiol.* 17: 603-610.
- Voisard C., Wang J., Mcevoy J.L., Xu P., Leong S.A. (1993) Urbs1, a gene regulating siderophore biosynthesis in *Ustilago maydis*, encodes a protein similar to the erythroid transcription factor GATA-1. *Mol. Cell. Biol.* 13: 7091-7100.
- Wang H., Qi M.Q., Cutler A.J. (1993) A simple method of preparing plants samples for PCR. *Nucl. Acid Res.* 21: 4153-4154.
- Wang J., Budde A.D., Leong A.S. (1989) Analysis of ferrichrome biosynthesis in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*: cloning of an ornithine-N⁵-oxygenase gene. *J. Bacteriol.* 171: 2811-2818.
- Watanabe T., Koller K., Messner K. (1998) Copper-dependent depolymerization of lignin in the presence of fungal metabolite, pyridine. *J. Biotechnol.* 62: 221-227.
- Watanabe T., Teranishi H., Honda Y., Kuwahara M. (2002) A selective lignin-degrading fungus, *Ceriporiopsis subvermispota*, produces alkylitaconates that inhibit the production of a cellulolytic active oxygen species, hydroxyl radical in the presence of iron and H₂O₂. *Biochem. Biophys Res. Comm.* 297: 9-18-923.
- Wexler M., Yeoman K.H., Stevens J.B., De Luca N.G., Sawers G., Johnson A.W. (2001) The *Rhizobium leguminosarum tonB* gene is required for the uptake of siderophores and haem as sources of iron. *Mol. Microbiol.* 41: 801-816.
- Windericks J., Castro I.M. (1994) Practical course in molecular biology of microorganisms. Universidade Federal de Ouro Preto-MG, pp59-63.
- Wolfger H., Mamnun Y.M., Kuchler K. (2001) Fungal ABC proteins: pleiotropic drug resistance, stress response and cellular detoxification. *Res. Microbiol.* 152: 375-389.

- Wyckoff E.E., Valle A.-M., Smith S.L., Payne S.M. (1999) A multifunctional ATP-binding cassette transporter system from *Vibrio cholerae* transports vibriobactin and enterobactin. *J. Bacteriol* 181: 7588-7596.
- Xiao X.D., Marzluf G.A. (1993) Amino-acid substitutions in the zinc finger of NIT2, the nitrogen regulatory protein of *Neurospora crassa*, alter promoter element recognition. *Curr. Genet.* 24: 212-218.
- Xu G., Goodell B. (2001) Mechanisms of wood degradation by brown-rot fungi: chelator-mediated cellulose degradation and binding of iron by cellulose. *J. Biotechnol.* 87: 43-57.
- Yadav J.S., Loper J.C. (2000) Cytochrome P450 oxidoreductase gene and its differentially terminated cDNAs from the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Curr. Genet.* 37: 65-73.
- Yamaguchi-Iwai Y., Dancis A., Klausner R.D. (1995) AFT1: a mediator of iron regulated transcriptional control in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 14: 1231–1239.
- Yamaguchi-Iwai Y., Stearman R., Dancis A., Klausner R.D. (1996) Iron-regulated DNA binding by the AFT1 protein controls the iron regulon in yeast. *EMBO J.* 15: 3377–3384.
- Yamaguchi-Iwai Y., Ueta R., Fukunaka A., Sasaki R. (2002) Subcellular localization of Aft1 transcription factor responds to iron status in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 277: 18914-18918.
- Yuan W.M., Gentil G.D., Budde A.D., Leong S.A. (2001) Characterization of the *Ustilago maydis* sid2 gene, encoding a multidomain peptide synthetase in the ferrichrome biosynthetic gene cluster. *J. Bacteriol.* 183: 4040-4051.
- Yun C.-W., Bauler M., Moore R.E., Klebba P.E., Philpott C.C. (2001) The role of the FRE family of plasma membrane reductases in the uptake of siderophore-iron in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 276: 10218-10223.
- Yun C.-W., Ferea T., Rashford J., Ardon O., Brown P.O., Botstein D., Kaplan J., Philpott C.C. (2000a) Desferrioxamine-mediated iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 275: 10709-10715.
- Yun C.-W., Tiedeman J.S., Moore R.E., Philpott C.C. (2000b) Siderophore-iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of ferrichrome and fusarinine transporters. *J. Biol. Chem.* 275: 16354–16359.
- Zhang D., Yang Y., Castlebury L.A., Cerniglia C.E. (1996) A method for the large scale

- isolation of high transformation efficiency fungal genomic DNA. *FEMS Microbiology Letters* 145: 261-265.
- Zhang X., Cui Z., Moye-Rowley W.S. (2001) Cross-talk between transcriptional regulators of multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 276: 8812-8819.
- Zhang Y.Z., Reddy C.A., Rasooly A. (1991) Cloning of several lignin peroxidase (LIP)-encoding genes: sequence analysis of the *LIP6* gene from the white-rot basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Gene* 97: 191-198.
- Zhao H., Eide D. (1996a) The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2454-2458.
- Zhao H., Eide D. (1996b) The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 271: 23203-23210.
- Zhao J., Kwan H.S. (1999) Characterization, molecular cloning, and differential expression analysis of laccase genes from the edible mushroom *Lentinula edodes*. *Appl. Environ. Microbiol* 65: 4908-4913.
- Zheng M., Doan B., Schneider T.D., Storz G. (1999) OxyR and SoxRS regulation of *fur*. *J. Bacteriol.* 181: 4639-4643.
- Zhou D., Hardt W.-D., Galán J. (1999) *Salmonella typhimurium* encodes a putative iron transport system within the centisome 63 pathogenicity island. *Infect. Immun.* 67:1974-1981.
- Zhou L.-W., Haas H., Marzluf G.A. (1998) Isolation and characterization of a new gene *sre*, which encodes a GATA-type regulatory protein that controls iron transport in *Neurospora crassa*. *Mol. Gen. Genet.* 259: 532-540.
- Zhou L.-W., Marzluf G.A. (1999) Functional Analysis of the Two Zinc Fingers of SER, a GATA-Type Factor That Negatively Regulates Siderophore Synthesis in *Neurospora crassa*. *Biochemistry* 38: 4335-4341.
- Zwiers, L.H., De Waard, M. A. (2000) Characterization of the ABC transporter genes MgAtr1 and MgAtr2 from the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Fungal Genet Biol* 30: 115-125.

Anexo I.

Seqüências dos transcritos de *P. chrysosporium* isolados a partir de células do micélio crescido com carência de ferro(III) no meio, obtidas utilizando-se o *primer* -40 M13 *foward* 23mer:

>1.1

GGAAGCAGTG	CGCCTGCCCCA	CAATTCGCCG	TCCCCCTGA	TATCATCTGA	TTCGGCGATG
ATTTAAACTC	CGGCAAATGT	GACATTCGAA	CTTTCGGCTC	CAGCACTGGC	AGGAGGTCAC
AAGCCCACAT	GACATTGCTA	TCTTATTGCA	TTATTAGAGA	ACCGCTGTTT	GTACCATAGC
ATGTACTACT	ACTGTAACATA	GCTTACATAC	GAATTATATC	AAGAGGACCC	GTGCCAACG

>1.2, 1.3 e 1.7

GGCCACGCGT	CGACTAGTAC	ATTGAAAGAT	GTCGGAAGGC	ACACCCAAGG	ACTAGCGGAG
CTGAAACGTC	TCGGCAGCAT	CATACAGAAC	GCCATCAACT	CCATCGAGGC	CAAGGTAGCG
TCGAAGGGCA	TCGACTTCCC	TTCGCTGAGC	ACGCCCACGA	CGCCGGAATC	GGAGGCTGCG
AGCAAGCTCC	CGGAGGTCGA	GCAAGCGTCT	GCTCTCATCG	TCGCTGCGGC	GTACCAGCTC
ATTCAGTCGT	ACGCTCTCCG	GCGTTGACGC	TTTGTAGCGA	TACAGCTCAA	TATATCGACT
CGCCGCCGC					

>1.8

TTGAAAGATG	TCGGAAGGCA	CACCCCAAGG	ACTAGTGGAG	CTGAAAGTTC	GGCAGCATCA
TACAGAACGC	CATCAACTCC	ATCGAGGCCA	AGGTAGCGTC	GAAGGGCATC	GACTTCCCTT
CGCTGAGCAC	GCCCCACGACG	CCGGAATCGA	GGCTGCGAGC	AAGCTCCCGG	AGTCGAGCAA
GCGTCTGCTC	TCATCGTCGC	TGCGGGCTCC	CAGCTCATTC	AGTCCCCAAT	GTTGCCGAGG
TTTTGAGGGA	CGCTGGTCTC	AGGGCGCCCA	TGTCAACGAC	ATTGCAA	

>1.11

ACCCACCCTC	TCCTCAAGCA	TTGCGCCACT	AGCGAGCCGT	GATTCGTACT	CACCACCTCC
AATCCTTTTCG	CCGTCATCCC	CTGCCTCTTC	GTTACCCAG	ACCACACCAC	CGCCCTTTTT
CGCTACCCGT	CGGCACAGCT	CCCCTCCCGC	ACGCCACGAC	ACACTAAACA	GCCACCCGTC
TCAGTCTACC	CGCTCGAGCC	AGCCGACCTC	CTATGACCAT	GATCCGCTCT	GACACGCCGA

>1.15

GAAGGCACGA	GAGTATATAT	AGCGTGAGAC	GTCACCACGA	CGATGCGGGC	GCGCTAGAGG
GGCTTGTACA	CAAAGATATA	GTACATAAGT	ACAACAAAGA	CTGTGAAAAC	AACTGAACC
AGAAAAGAAC	AAGATAGATA	GAACACAACA	GAATCCGCAA	GATGTTGTTG	ATACAGATTG
AGCAAGAATA	AAAAGCAGGC	GGACAGCGAA	GGGAAGGTGA	GGACGGG	

Seqüências dos transcritos de *P. chrysosporium* isolados a partir de células do micélio crescido com suprimento de ferro(III) no meio, obtidas utilizando-se o *primer* -40 M13 *foward* 23mer:

>2.3

TGTAACGCGT	GCGGGCTGTC	TACGCCGCTG	TGGAGACGAT	CCTCCGCGAG	AGCTTTCCTG
GAAAGTGCGC	TGCGTTCGAG	AAGGAGTGGG	GCATGCCTGA	AGCGTGGACG	GCGAAATCGC
TCCTCATGCA	GGTGTTAATA	TCGATGGACG	ACTACTATCC	CAAAGAACCC	GGTGCAGGTC
TCTGGGATGG	AGCCTGAACT	TTGCAAAAAA	AAAAAAAAAA	AGTACTAGTC	GACGCGTGGC
CAATCACTAG	TAATTGCGCG	CCGCTGCAG	GTCGACCATA	TGGGAGAGCT	CC

>2.46

GGCCACGCGT CGACTAGTAC TTTTTTTTTT TTTTTTTGAT GGGGAAACGT GTTTCGCGTG
TTACATGTAA CTCTGTAGCT ATCGACAGTT TATGAATACA GGGTGTGGCA ATGTTGGCTT
CTACGGGAGA TGCGGTACGA AGTGTGATGG GATGCGTGAC TGTATGCAAG TTGTGTGTGC
GACAAAAGGG AAACGGCTGG CAATGTGCAG ACAATGCAAA AAGGAAAGAG GGTACTAGTC
GACGCGTGGC CAATACTCAG TGAATTCGCG GCCGCCTGAC GGTCA

Sequências dos transcritos de *L. edodes* isolados a partir de células do micélio crescido com carência de ferro(III) no meio, obtidas utilizando-se o *primer* -40 M13 *foward* 23mer:

>3.28

GACAACAATG AGTATGCGAT GCGGGTACGA GAGATCCTAA CAACAGCGGA GGATAGCAAC
ACAGCACAAA CACCCCTCTT TTCACCTCGG CGCCCTCAT AACGAGAGCA TGA CTGGCGC
ACGAGCGAAA ACCCAGAGCT CCTCCAGAAC GCGGTACGAA CAGTTCGGTG ACGGTTCCGT
GGCGATCCGT TGATCTAGGG GTTGCCTCT TCGACTGCAG GCCACACGCG TGCAA

>3.48

CCACACCACA CCACTACCAC CACCACCACT ACTACTATCA CATCCACCTC TTGAATAATT
TCAAGATGAT GAGCCTCGTT GCCGCACGTG TTCCATCTAT TGCCCTCTGG ACAACGCTCC
AAGTCGGCTT GTGGGGCTTC GTATACAGCC AGTACCGGAC ACCCAGCGAG TTCCACACCC
GCTGAAGTCG CGATACCAAG GCACATTGGC

Sequências dos transcritos de *L. edodes* isolados a partir de células do micélio crescido com suprimento de ferro(III) no meio, obtidas utilizando-se o *primer* -40 M13 *foward* 23mer:

>4.1

TACTCCCCGT TGTGGCGGTC ACAGTGTTTT CAGAGACCGA AACGGTAGTA GCAGTAACAG
TCTGGCCAGA GACCGAGACT GTCGTGGCAG TTATAGTAGG CTCATTTGAA GTCGTGGTTG
TCTCCGTGAC CACTCCCGAA ACCGTGGTCG TGGCCTGAGG GCGGACGAG ACGGTCGTTG
CGGTGATGTC TGACCGGAGC AGACGACACT GTCTCGCGAG TGATTGTCTA ACGGGCGGAG
AAGATATCGT TGTCGCATG

>4.4

GGAATTCGAC CGGCCACGCG TCGACTAGTA CTGGCCACGC GTCGACTAGT ACCCCGTTGT
GGCGACTGTG GGAGAGCGTA GAAGAGGGGC TGTGAGGACG ACTCGCGCGG ACCTCCGCCG
ATAGAAGACT TGACGGATGG GGCAGAGGCG GACGTTCTGT TCGGGACTAG GAACTCGCGT
GCACCCTCCG GGTGGACTTA AGGAGGACCG GCGTCTCGAC TTCGACAAAT CCTGGGATCG
TTGGTGATGT GAGCCTTCAA AGACTCGGCA TAATCATGGG CAAGTGAGAG AGAAGCGCAC
GTACCGTGAT CGTGCAAGT

>4.8

GGCCACGCGT CGACTAGTAC TGGCCACGCG TCGACTAGTA CCCC GTTGTG GCGGTGCGAG
TGTTTTT CAGA GACCGAAACG GTAGTAGCAG TAACAGTCTG GCCAGAGACC GAGACTGTGC
TGGCAGTTAT AGTAGGCTCA TTTAAGTCGT GGTGTCTCC GTGACCACTC CCGGAACCGT
GGTCGTGGCC TGAGGGGCGG ACGAGACGGT CGTTGCGGTG ATGGTCTGAC CGGGAGCAGA
CGACACTGTC GTCGCAGTGA TTGTCTGACC GGGGCGAGAA GATATCGTTG TCGCAGTGAC

>4.10

AACGAAGCTT TGAAGTCGTG GTTGTCTCCG TGACCGCTCC CGAAACCGTG GTCGTGGCCT
GAGGGGCGGA CGAGACGGTC GTTGCGGTGA TGGTCTGACC GGGAGCAGAC GACTGTGC
TCGCAGTGAT TGTCTGACCG GGGGCGAAG ATATCGTTGT CGCAGTGACT GTATTGCCAG

>4.14

>4.14

GGCCACGCGT	CGACTAGTAC	TCCGTTGTGG	TGGCCACGCG	TCGACTAGTA	CCCCGTTGTG
GCGGTCACAG	TGTTTTTCAGA	GACCGAAACG	GTAGTAGCAG	TAACAGTCTG	GCCAGAGACC
GAGACTGCTG	TGGCAGTTAT	AGTAGGCTCA	TTTGAAGTCG	TGGTTGTCTC	CGTGACCACT
CCCGAAACCG	TGGTCGTGGC	CTGAGGGGCG	GACGAGACGG	TCGTTGCGGT	GATGGTCTGA
CCGGGAGCAG	ACGACACTGT	CGTCGCAGTG	ATTGTCTGAC	CGGGGCAGAA	GATAT

>4.18

GGAATTCAGT	TGGCCACGCG	TCGACTAGTA	CACCTTTCTG	GTGGCCACGC	GTCGACTAGT
ACTGGCCACG	CGTCGACTAG	TACTGGCCAC	GCGTCGACTA	GTACCCCGTT	GTGGCGACTG
TGGGAGAGCG	TAGAAGAGGG	GCTGTGAGGA	CGACTCGCGC	GGACCTCCGC	CGATAGAAGA
CTTGACAGAT	GGGGCAGAGG	CGGACGTTTC	TGTCGGGACT	AGGAACTCGC	GTGCACCCTC
CGGGCGGACT	TAAGGAGGAC	CGGCGTCTCG	ACTTCGACAA	ATCCTGGATC	GTTGGTGATG
TGAGCCCTCA	AAGACTCGCA				

>4.19

CTAGTACTGG	CCACGCGTCG	ACTAGTACTG	GCCACGCGTC	GACTIONTACA	ACCGTATGCG
CTCGATCCTA	TGAGTTTTTA	ACTTCATGAT	TAAGCGCATT	CATTGCTGAT	ATATCTATAG
ACAACACTGA	CGCCCGATAC	GACACAACGA	CCTCGACGAC	TCGACAAGCT	CATCTTCCAC
TGACTCCGTA	GGGCCCCGCC	TATGCTTGTA	ATCGTACCGT	GCTAACGAAG	CTTAGTCGAC
CTCTACTTCT	TCAACAGG				

>4.30

GGCCACGCGT	CGACTAGTAC	ACCCCGTTGT	GGCGGTCACA	GTGTTTTTCAG	AGACCGAAAC
GGTAGTAGCA	GTAACAGTCT	GGCCAGAGAC	CGAGACTGTC	GTGGCAGTTA	GTAGTAGGCT
CATTTGAAGT	CGTGGTTGTC	TCCGTGACCA	CTCCCGAAAC	CGTGGTCGTG	GCCTGAGGGG
CGGACGAGAC	GGTCGTTGCG	GTGATGGTCT	GACCGGGAGC	AGACGACACT	GTCGTCGCAG
TGATTGTCTG	ACCGGGGGCA	GAAGATATCG	TTGTCGACGT	GACTGTATT	

>4.33

GGCCACGCGT	CGACTAGTAC	TACTCCGTTC	TGGTGGCCAC	GCGTCGACTA	GTACTIONGGCA
CGCGTCGACT	AGTACCCCGT	TGTGGCGGTC	ACAGTGTTTT	CAGAGACCGA	AACGGTAGTA
GCAGTAACGG	TCTGGCCAGA	GACCTAGACT	GTCGTGGCAG	TTATAGTAGG	CTCATTTGAA
GTCGTGGTTG	TCTCCGTGAC	CACTCCCGAA	ACCGTGGTTC	TGGCCTGAGG	GGCGGACGAG
ACGGTCGTTG	CGG				

>4.34

CTAGTACCCC	GTTGTGGCGG	TCACAGTGTT	TTCAGAGACC	GAAACGGTAG	TAGCAGTAAC
AGTCTGGCCA	GAGACCGAGA	CTGTCGTGGC	AGTTATAGTA	GGCTCATTTG	AAGTCGTGGT
TGTCTCCGTG	ACCACTCCCG	AAACCGTGGT	CGTGGCCTGA	GGGGCGGACG	AGACGGTCGT
TGCGGTGATG	GTCTGACCGG	GAGCAGACGA	CACTGTCGTC	GCAGTGATTG	TCTGACCGGG
GGCAGAAGAT	ATCGTTGC				

>4.38

TGCTAGCGGC	GAGTTATTGG	AGCAGTTTTT	GTTTGTGCAT	CACATGAAAG	GCTGGACGTA
TATACCCGAA	TTAATTCAGG	AAAAAAAAAA	AAAAAAGTA	CTAGTCGACG	CGTGGCCAAT
CACATGTGAA	TTGCGGGCCG	CCTGCAGGTC	GACCATATGG	GAGAGCTCCC	AACGCGTTGG
ATGCATAGCT	TGAGTATTCT	ATAGTGTAC	CTAAATAGCT	TGGGTGCTAA	TCATGGTCAT
AGCTGTTTCC	TGTGTGAATT	GTTATCCGCT	CACAATTC		

>4.40

CTAGTACCCC GTTGTGGCGA CTGTGGGAGA GCGTAGAAGA GGGGCTGTGA GGACGACTCG
CGCGGACCTC CGCCGATAGA AGACTTGACA GATGGGGCAG AGGCGGACGT TCGTGTCCGG
ACTAGGAACCT CGCGTGCACC CTCCGGGCGG ACTTAAGGAG GAGGACCGGC GTCTCGACTT
CGACAAATCC TGGGATCGTT GGTGATGTGA GCCTTCAAAG ACTCGGCATA ATCATGGCAA
GTGAGAGAGA AGCGCACGTA CCGTGATCGT GCAGAGTGGT GCGAATAGAG T

>4.41

CTAGTACTGG CCACGCGTCG ACTAGTACCC CGTTGTGGCG CGATTCCTGG TATGTTCTTT
AAGCTCCATC TAATGTGAAC CATGGAGCCC TGATATTGAT GATAGGGACA GTCAAGATCG
TCGAAGTCGC TAACCTCCCT GTTTAGGTCA GAGATGTCGT GCAAAGTGAA TGCTAGCGTT
ACTAATTACA AGTGCAGTAC GTCACAAATC AGGCAACAAG AATAATAGTC AAGCTGCTGG
AGAGCTATCC TCGGAATCGT CAGGAAGCGT GGAGGCGATA TGGTTACCAG CGATGTCGT

>4.43

CTAGTACTGG CCACGCGTCG ACTAGTACCC CGTTGTGGTG GCCACGCGTC GACTAGCTCC
CCGTTGTGGC GCAGGATAGC AACTCCAGCC CCCACGCTCA GCGGGCCGAA ATGCAAAGTT
CCTCCGCTCC AACTGACAG GCTGCGCGGA GAAGTCGCGT TCAGGGCGGT AATATCCGTG
GTATGGAAGC GTCAGGGATG GTAGGGTGCG AGAGGAAACC AGGCCTTGAA GCTCATGTCC
ACACGAGCGT CACACGCTGC ATAGCTACGA TCTGCTAGCA GAGCAACCAC AGAGTAAGCA

>4.45

CTAGTACTGG CCACGCGTCG ACTAGTACCC CGTTGTGGCG ACTGTGGGAG AGCGTAGAAG
AGGGGCTGTG AGGACGACTC GCGCGGACCT CCGCCGATAG AAGACTTGAC AGATGGGGCA
GAGGCGGACG TTCGTGTCGG GACTAGGAAC TCGCGTGCAC CCTCCGGGTG GACTTAAGGA
GGACCGGCGT CTCGACTTCG ACAAATCCTG GGATCGTTGG TGATGTGAGC CTTACAGAC
TCGGCATAAT CGTGGGCAAG TGAGAGAGAA GCGCACGCAT GCGTAT

>4.53

CTAGTACTGG CCACGCGTCG ACTAGTACTG GCCACGCGTC GACTAGTACC CCGTTGTGGC
GGTCACAGTG TTTTCAGAGA CCGAAACGGT AGTAGCAGTA ACAGTCTGGC CAGAGACCGA
GACTGTCTGT GGCAGTTATA GTAGGCTCAT TTGAAGTCGT GGTGTCTCC GTGACCACTC
CCGAAACCGT GGTCTGGGCC TGAGGGGCGG ACGAGACGGT CGTTGCGGTG ATGGCTCGAC
CGGGAGCAGA CGACACTGTC GTCGCAGTGA TTGTCTGACC GGGGGCAGAA GATATCGTTG
TCGCAGTGAT CGTATTGCCA GGAGCCGAGA CACAGAAATT ATTGTCGCTG TGGTAGTCTC

>4.54

CTAGTACCCC GTTGTGGCGC GATTCCTGGT ATGTTCTTTA AGCTCATCTA ATGTGAACCA
TGGAGCCCTG ATATTGATGA TAGAGACAGT CAAGATCGTC GAAGTCGCTA ACCTCCCTGT
TCAGGTCAGA GATGTCGTGC AAAGTAAGTG CTAGCGTTAC TGATTACAAG TGCAGTACGT
CACAAATCAG GCAACAAGAA TAATAGTCAA AGCTGCTGGA GAGCTATCCT CGGAATCGTC
AGGAAGCGTG GGAGGCGATA TGGTTACCAG CGATGTCCGT ACAAAGACG AGGAAAGACC
GGAAAACAG GCTCTTCATC CGCTGGACGA AGAACCACG ACAGTTGTCG ACGTCGAAAC

>4.59

CTAGTACTGG CCACGCGTCG ACTAGTACGG CCACGCGTCG ACTAGTACTA CTCCGTTCTG
GTGGCCACGC GTCGAGTAGT ACTGGCCACG CGTCGACTAG TACTACTCCG TTCTGGTGGC
CACGCGTCGA CTAGTACTAC TCCGTTCTGG TGGCCACGCG TCGACTAGTA CTGGCCACGC
GTCGACTAGT ACCCGTTTGT GGCGGTCACA GTGTTTTTCA AGACCGAAAC GGTAGTAGCA
GTAACAGTCT GGCCAGAGAC CGAGACTGTC GTGGCAGTTA TAGTAGGCTA CTTTGAAGTC
GTCCTTGTCT CCGTGACCAC TCCCGAAACC GTGGTCGTGG CCTGAGGGGG CGGACGAGAC

Anexo II.

Sequências, obtidas utilizando-se o *primer* -40 M13 *foward* 23mer, dos fragmentos amplificados de cDNA sintetizado pelo método SMART™ 5' RACE utilizando como molde RNA de micélio de *P. chrysosporium* crescido com suprimento de ferro juntamente com os *primers* UPM e GSP1 (Tabela 2):

>6.35, 6.43, 6.51, 6.58, 6.62 e 6.73

AAGAGACAAA	TGCGTCGTAT	TCCGCCATTG	AGAACGTCAC	TGGCTCGATC	TGCGGATCAT
CAGCCGTGAC	ACCCGATGCG	GGGAGCTATT	GAAGTGTAC	TGCCCAGAGT	
CAAATCTGTG	CTCCATCTAG	CAGGGTTGTC	AGGAAACATT	CAGGGCATAT	TGATTGCCTG
CGCACCTGGA	GATATTCTTC	TTCCGAGATT	ACTTGGAATT	TAACCTTGAC	ATGGTTCTGT
TAACACAAGG	CGTTGCACAG	ATGAGACCAG	ACGAAGCGCA	CTTGATCGAA	TGGCTGCAGC
AACCACGGCT	GTTCTGGACT	GAATCCTTGT	CCACGA		

>6.37

CGGATTGTAG	TTGGGTATCT	TGGCAGGAGT	CGTCGCAAAG	GCATTGTCAT	ACCACTCCTT
GCGGATCAAC	ACCTGGTCGA	CGCCGCTGGA	GTGGACCGAG	TAAGCAACCA	GTGCGAGCTC
GCCCGGCGGG	ACCTTCGCAG	CAACGCAGGC	GGCATGTGCC	TCCGCACCGT	GAGGGTCGGC
ATCAGCAGTA	AGGATGACGA	AGTGAATCGT	AGGCTTGGGG	CCGGAGAATA	CTACGACTTG
GTCGAAGAAG	GCGCCGCGGG	TCTCTTCTCC	ACCTGGCGAA	GGAGTATTGA	CGTCAAAGTT
GATCTTGAAT	GCTATCATGC	TGTCTCTGCG	GTTGTTGGCA	ATCCAGAGGG	TTCTGAATCC

>6.39

GGCGGTATTC	CGCAGGTACG	TGCCTGCAGG	AGGACATATC	CCACCACTTG	TGCTAAATTT
TTGCAGGCAG	GAGACTCGGC	CATTTTACTC	GAGTACGGCG	AGCTTCTCCT	GGATTTCCAC
GTGCGCGCCC	GAGTACATGC	CTTCGAACGC	GCCCTATCTG	AGCGCAATGT	TCCGGGAGTG
TGGTCCATGG	CGCCATGCAT	CCGCTCTACA	ATGGTATAAA	TCCCCCTCCG	CCTCCGATGG
AGCTGAGCTC	ATCCGCTTGT	CAGATACACT	TTGACCCAAC	GGTGATATCA	CAGTCCAACC
TGCTTTCTGT	GCTCAGAGAT	GTGGAGGCTT	CGCTGCCCGA	TAGCATGGCT	GATACCT

>6.40

TGCTCGATTC	GAGGATGGTG	TACGCCTGGG	AAAATTGTTA	CACAAAGGTC	AACTGAAACG
ATCGAGCGAG	ACGTACGTGT	TGCTCGAGCC	TCAGCGTAGG	CGGAACATGC	CCGCGGCAAA
CGTGCGGCCA	TCTAGAGACA	CCTGCAGATC	GAGCGAATGC	CTCTCCGACT	GGTATTCCGC
GACGATGAAG	TACTCCGAGG	ACTTTGCGAA	GCCGACGACA	TGATCGAACA	GCTTCGTCTT
CTTGTTGTAG	AAGTCGGTGC	CGCTGATGAG	CTCGAGCGGT	TGTCGATCGA	GAAACGCCGC
TGCGACCTT	CCTTGATCTT	GAACGACTCG	CAAATAATCT	GGGGTAGAGT	CGAT

>6.41

TCGCGGAAAC	GACCAGCCAG	TCCGCAGGCA	CTTCGCGAAC	CTCGGCCTTC	TTGAGTTCTA
TCAGATACTG	CGGATCACGG	TCAGAAATCG	TGCTAACTGA	GGAGGCAAAG	TCGAGGATAC
CTCTTCGCCT	GCAACGGTAG	CATACTGCAA	GGCAGGTCGT	CGTAGTCGTT	TTCTCACTAT
GAATGTGAGC	CGGATTAACT	ATACGAGAGA	GTGTGAAACG	AACCATCACG	CAGCTCGTCG
ACAAGTTCGC	TCTCGATAAC	TTGGACTGTC	TAGAGATATG	GTGAGTGCGC	ATAGTGGGAT
GAGGTAGGCA	GGGCTACGCA	CCACAGTCAG	CTCGTCTACC	TCTGGCGCGC	TGTTCTCCAC

>6.44

AGAAGAAGAG	GATGAGAGGC	TTGCGGAAGT	CACGGTGGAT	CTGGCGACGC	AGGACATGGA
AGTAGTTCGC	AGGCGTCGTC	GGGTAAACGA	CCTGCATGTT	GCAATCCTGG	TGCTGGCGCT

CGAGACCGGT GCGCTGCAAC CACTTCCTCT CGCCAGACGC GATGAACTGG TCGATGATGA
CTTGTGCGTT GTTGGCGAAG TCACCGAACT GCGCCTCCCA GATGGTCAGG TTGTCGGG

>6.50

CCTTGAATTG AAGAGACAAA TGCCTCGTAT TCCGCCATTG AGAACGTCAC TGGCTCGATC
TGCGGATCAT CAGCCGTGAC TCCCGATGCG GGGGAGCTAT TGAAGTACCT CGAACTTGTA
CTGCCAGAG TCAAATCTGT GCTCCATCTA GTAGGGTTGT CAGGAAACAT TCAGGGCATA
TTGATTGCCT GCGCACCTGG AGATATTCTT CTTCCGAGAT TACTTGGAAT TTAACCTTGA
CATGGTTCTG TTAACACAAG GCGTTGCACA GATGAGACCA GACGAAACGC ACTTGATCGA
ATGGCTGCAG CAACCACGGC TGTTCTGGAC TGAATCCTTG TCCACGACCC CCATGTATGC
CACGG

Sequências, obtidas utilizando-se o *primer* -40 M13 *foward* 23mer, dos fragmentos amplificados de cDNA sintetizado pelo método SMARTTM 5' RACE utilizando como molde RNA de micélio de *P. chrysosporium* crescido com suprimento de ferro juntamente com os *primers* UPM e GSP2 (Tabela 3):

>15.4 e 15.33

GGAATTCGAT TACGCCGCTG TGGAGACGAC GACACCTCAT GAAGGTGGTC AATGACTGGC
AGCTCTTGGA GGACGCGTTC GGCAGTCTTA TTCAGCGGAT CGCGGCATCG GTGAGGATAT
AGCGCATGCT TCGGCTGATC GCACCACTGA CTAGTCTTTA GGGTGCACAG ATGAACCCAA
TATTGCATGC GCTGCCAGAC GCAGCAGCCT TTTGGAAACT GACGACAGCT CGAGAAGTTA
TTCTCACTGG GTTCCAGCAG GAGCTATATG CCCTCGTATG AGCGTCCGCT AGCCTACTGG
TTGCTCTCGC AAATACTCGA GAAGCACCAA G

>15.6 e 15.12

GGAATTCGAT TACGCCGCTG TGGAGACGAC CGGTCGGCGA GGTCATCGGC AAGCTTGGGT
GAGATCAATG TAACCTTCTC GGGCTGCATG TACCGGTTCT TGAACGCACG ACCCAGCTTG
TCAAGCATCT CCGCCTTGAG TGACCGAAGA TGCTGGTCCT GCTCTTCCGG ATCCATCAAT
TCGTCTTTGC CTTCCCGCTT CGCTGCACCC CTTTGCGCCT CCGTGATGCC TTCGCCGTAC
GGTTGCCCAT TGACGGAGCA CTTCTGGAAC TCCATGACGT TCTGAGTCAG CGTCCCGG

>15.35

GGAATTCGAT TACGCCGCTG TGGAGACGAA GACCCGGACT CGAAGAGTGT TACCGCAGAG
CTGAAAGGAC TGGGCTTCCC AACAAGCTCA GGACTAGCTG TTCGCTTCAT TCTGCAAGAC
AGAAGCCGCA AAGATGACAG CAAATAAGAA ATGGTGAGCA AAGCTAGTGG ACCGAGGCAA
GACGTGTGAT GAGGACGCGG ACAAGGATCA ACTCTCTTAA GCGCCTACCG TGTCTCATTA
AGCCGCGCGA CGAGGATGAA GCTACTACTT TATTATGTGG CAAAA

>15.37

GGAATTCGAT TACGCCGCTG TGGAGACGAC GACACCTCAT GAAGGTGGTC AATGACTGGC
AGCTTTTGGA GGACGCGTTC GGCAGTCTTG TTCAGCGGAT CGCGGCATCG GTGAGGGTAT
AGCGCATGCT TTGGCTGATC GCACCACTGA TTAGTCTTTA GGGTGCACAG ATAAACCCAA
TATTGCATGC GCTGCCAGAC GCAGCAGCCT TCTGGAAACT GACGACAGCT CGAGAAGTTA
TTCTCACTGG GTTCCAGCAG GAGCTATATG CCTCGTATGA GCGTCCGCTG GCCTACTGGT
TGCTCTCGCA AA

Sequências, obtidas utilizando-se o *primer* -40 M13 *foward* 23mer, dos fragmentos amplificados na reação de PCR *nested* com os *primers* NUP e NGSP2 e o produto da primeira PCR a qual foi realizada usando os *primers* UPM e GSP2 e cDNA sintetizado pelo método

SMARTTM 5' RACE para a condição de crescimento de carência de ferro(III) no meio de cultivo (Tabela 4):

>16.17 e 16.26

GATTGTAACG	CGTGCGGGCT	GCGAGCTCGA	GGGCGAGAAG	AGGACGGGGT	CGTACATGGA
CGGGTCGCAG	GCATCGGCCT	CTTCGTCCCA	GGAAAACGGC	ACGACCGACG	GAGGCTCTGC
TGCGGCGGCC	TTGCCGGCAA	AGTCTGCGTC	CGAGGGCAGG	AAGTGGATCG	AGTCGCAGAC
GGAGAGGCGG	TGGAGCAGCT	CGAGCCCGTC	GAGGTGTGAT	CGCAGGGGAG	CCTCGACGGT
AGTCGTCCAT	TGGGCTTGAG	GTGTGTGTGA	GCGAGTGGGT	GACCA	

>16.18

AGTGCGGCGC	TGAGGCCAC	GAGTCTATCC	GTCTCGTGTT	CCACGATGCT	ATTGCCATCT
CTCCTGCTAT	GGAGGCCAG	GGAAGTTCGG	CGGTGGTGGT	GCTGACGGCT	CCATCATGAT
CTTCGACGAC	ATCGAGCCCA	ACTTCCACCC	TAACATTGGC	CTCGACGAGA	TTATCAACCT
CCAGAAGCCG	TTCGTCCAGA	AGCACGGTTG	CACCCCTGGT	GACTTCATCG	CCTTCGCCGG
TCGTGTCGCG	CTCAGCAACT	GCCCGGGTGC	CCCACAGATG	AACTTCTTCA	CTGGTCGTGC
TCCTGCTACC	CAGCCCGCAC				

>16.21

GCCGTGGTCA	AGGAGAAGCG	CGCCACCTGC	TCCAACGGCG	CCACCGTTGG	CGACGCGTCC
TGCTGTGCTT	GGTTCGATGT	CCTCGACGAC	ATCCAGCAGA	ACCTGTTCCA	AGGAGGCCAG
TGCGGCGCTG	AGGCCACGA	GTCTATCCGT	CTCGTGTTCC	ACGATGCTAT	TGCCATCTCT
CCTGCTATGG	AGGCCAGGG	AAGTTCGGCG	GTGGTGGTGC	TGACGGCTCC	ATCATGATCT
TCGACGACAT	CGAGCCCAAC	TTCCACCCTA	ACATTGGCCT	CGACGAGATT	

>16.24

GATTAAGCAG	TGGTAACAAC	GCAGAGTACG	CGGGGGTCTT	TCGCCCCCGC	TGCCCCCTCCT
TCACTTACTC	TGCCAGTCCT	TCTGCCAATC	CTTCCGCCAG	CACTCCCAGG	AGGGTCAGCC
CCTACCGCCC	CTGGTCACCC	ACTCGCTCAC	ACACACCTCA	AGCCCAATGG	ACGACTACCG
TGCAGGCTCC	CCCTGCGATC	ACACCCTCGA	CGGGCTCGAG	CTGCTCCACC	GCCTCTCGCT
CTGCACTCGA	TCCAATTCTT	GCCCTCGGAC	GCAGACTTTG	CCGGCAA	

Sequências, obtidas utilizando-se o *primer* -40 M13 *foward* 23mer, dos fragmentos amplificados na reação de PCR *nested* com os *primers* NUP e NGSP2 e o produto da primeira PCR a qual foi realizada usando os *primers* UPM e GSP2 e o cDNA sintetizado pelo método SMARTTM 5' RACE para a condição de crescimento de suprimento de ferro(III) no meio de cultivo (Tabela 5):

>17.6

AAGCAGTGGT	AACAACGCAG	AGTACGCGGG	GGCGAAGATC	CAAGACAAGG	AAGGCATTCC
CCCAGACCAA	CAACGCCTCA	TCTTCGCGGG	CAAGCAGCTC	GAGGATGGCC	GCACTCTCTC
CGACTATAAT	ATCCAGAAGG	AGTCTACTCT	TCACCTTGTC	CTTGGTCTAC	GTGGAGGCAT
GCAGATCTTT	GTCAAGACAC	TTACCGG			

>17.7

AAGCAGTGGT	AACAACGCAG	AGTACGCGGG	GGTCTTTTCG	CCCCGCTGCC	CCTCCTTCAC
TTACTCTGCC	AGTCCTTCTG	CCAATCCTTC	CGCCAGCACT	CCCAGGAGGG	TCAGCCCCTA
CCGCCCCTGG	TCACCCACTC	GCTCACACAC	ACCTTCAAGC	CCAATGGACG	ACTACCGTGC
AGGCTCCCCC	TGCGATCACA	CCCTCGACGG	GCTCGAGCTG	CTCCACCGCC	TCTCGCTCTG
CGACTCGATC	CACTT				

>17.8 e 17.38

TGTAACGCGT GCGGGCTGCG AGCTCGAGGG CGAGAAGAGG ACGGGGTCGT ACATGGACGG
GTCGCAGGCA TCGGCCTCTT CGTCCCAGGA AAACGGCACG ACCGACGGAG GCTCTGCTGC
GGCGGCCTTG CCGGCAAAGT CTGCGTCCGA GGGCAGGAAG TGGATCGAGT CGCAGAGCGA
GAGGCGGTGG AGCAGCTCGA GCCCCTCGAG GTGTGATCGC AGGGGGAGCC TGCACGGTAG
TCGTCCATTG GG

>17.39

AAGCAGTGGT AACAAACGCAG AGTACGCGGG CTCTCCGACG ACGCTGGGCA GGCGGCCTCG
CGTCCTGGAT CTGCACGCAC GCCTGCGAGC GGTTCAGGTA CGCCCGCGCC TCAGCACTAC
GAGCCTGCTC CACATGCTGG GCCGAACCGC CTGGTGCCTT CGACTCCCCA GTCTGGACAC
GTGCATCACC AAAACCACCC TGCGGCTAGC TCAAGCAGGG ATGCCCCTCA GCAGCCCGCA
CGCGTTACAA A

>17.40

TGTAACGCGT GCGGGCTGGC GGACAAGGCA CGGCTGGAAT TGTCGGCTGA GACGATGAAG
CCATTCTTGG GAATGGGCCT GATCCCGCGT ACTCTGCGTT GTTACCACTG CTTA

>17.62

AAGCAGTGGT AACAAACGCAG AGTACGCGGG AAGCAGTGGT AACAAACGCAG AGTACGCGGG
CTTTCGCCCC CGCTGCCCCT CCTTCGCTTA CTCTGCCAGT CCTTCTGCCA ATCCTTCCGC
CAGCACTCCC AGGAGGGTCA GCCCCTACCG CCCCTGGTCA CCCACTCGCT CACACACACC
TCAAGCCCAA TGGACGACTA CCGTGCAGGC TCCCCCTGCG ATCACACCC